

Scattering della luce

Una particella carica genera un campo elettrico

Le particelle cariche vengono accelerate dai campi elettrici.

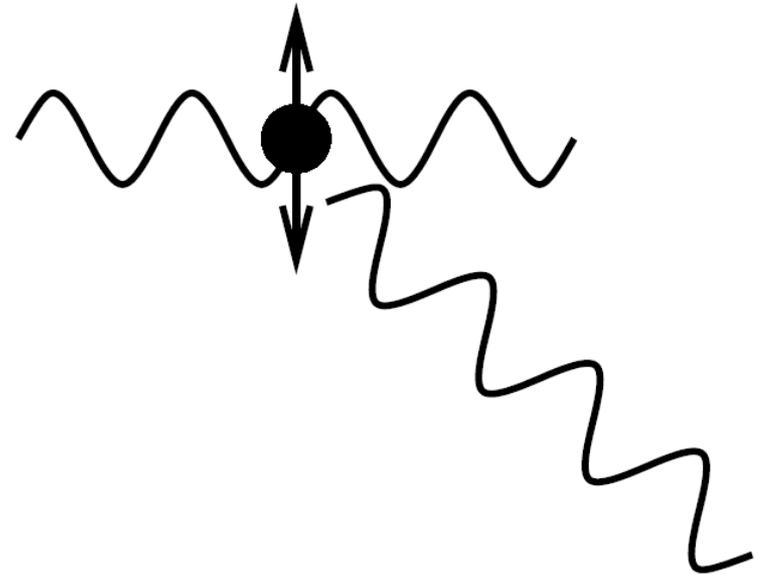
L'accelerazione di una particella carica perturba il campo elettrico.

L'accelerazione di elettroni genera dei fotoni!

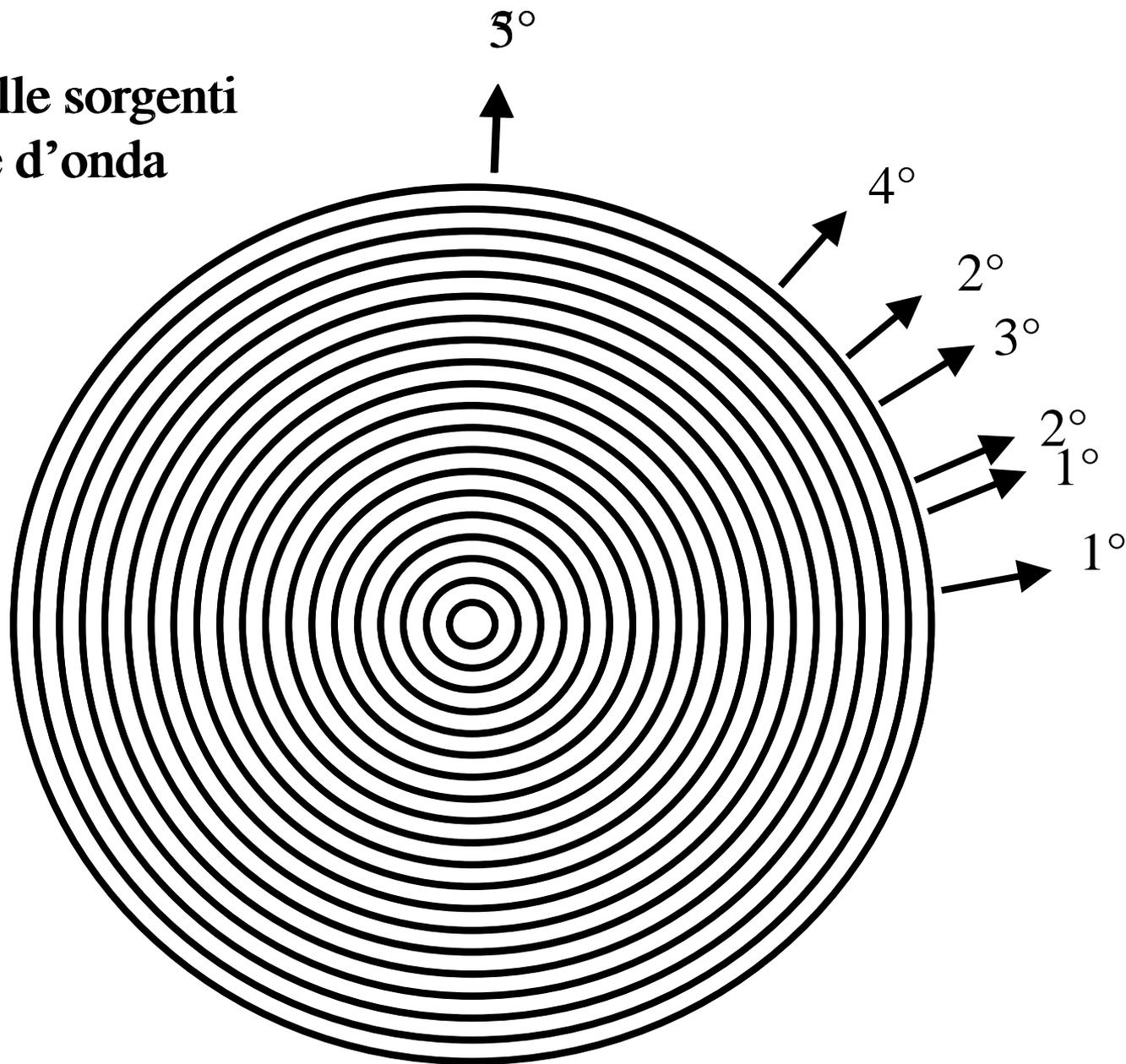
Quando un elettrone interagisce con un'onda elettromagnetica può oscillare con la stessa frequenza e diventare una sorgente di radiazione

Processo chiamato "scattering".

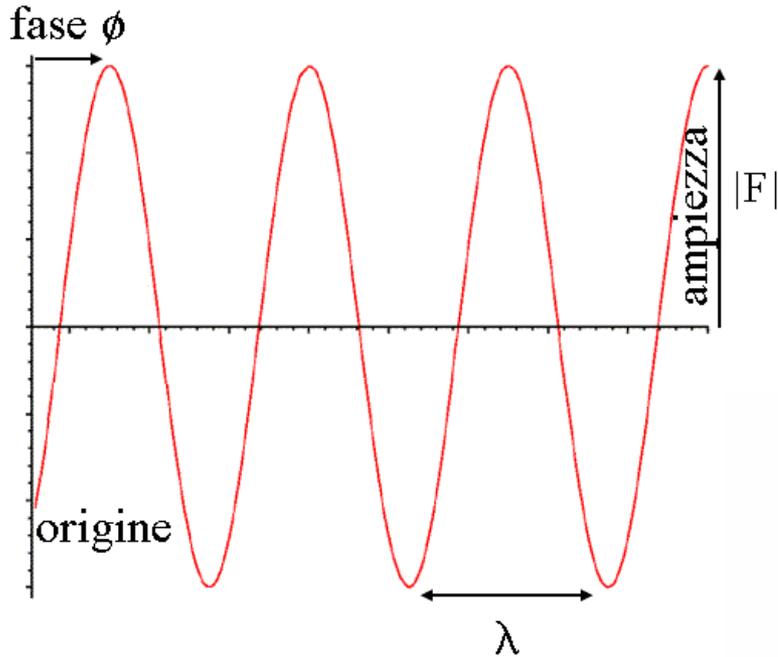
Dall'analisi dello scattering si può risalire alla posizione degli scatteratori



**Distanza delle sorgenti
3 lunghezze d'onda**

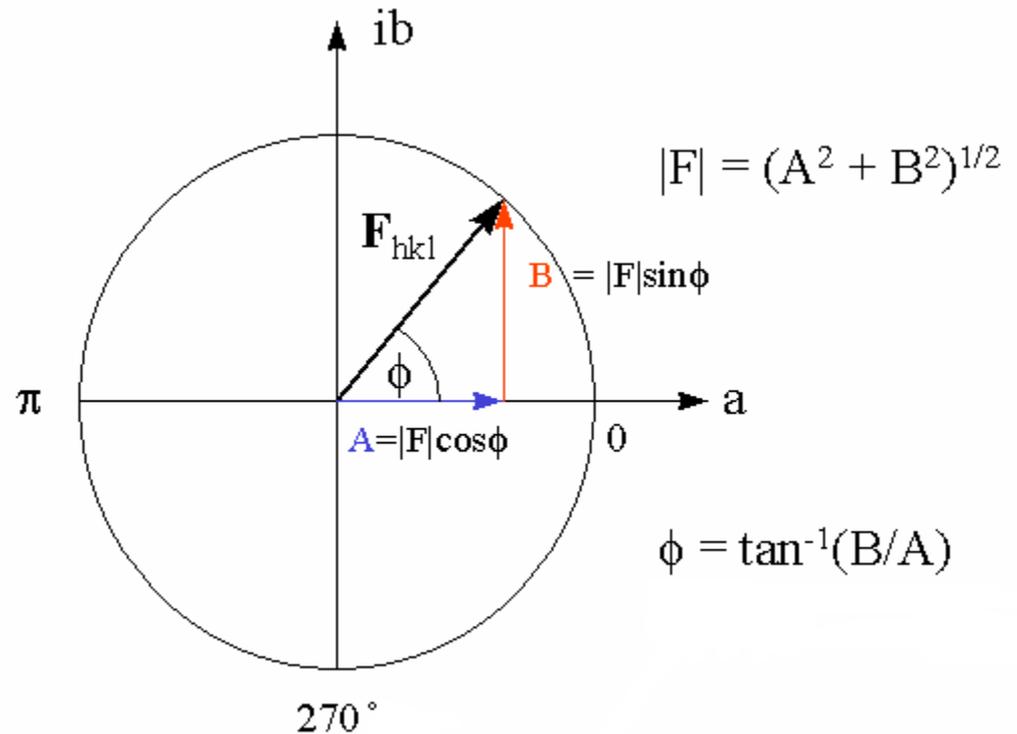


Onde nel diagramma di Argand



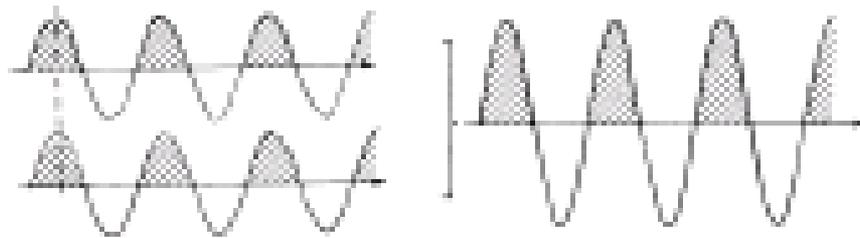
- Le onde \mathbf{F} sono caratterizzate da una ampiezza $|F|$ e da una fase ϕ

$$\mathbf{F} = |F| \exp(i\phi) = |F| (\cos\phi + i\sin\phi)$$

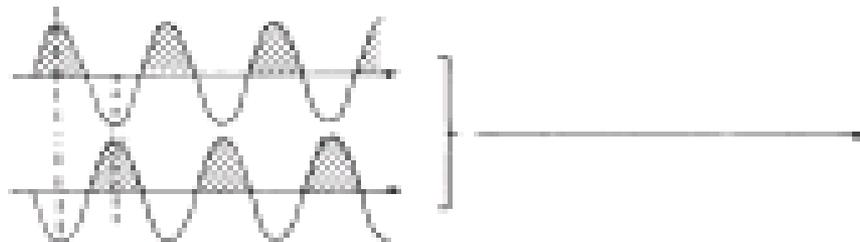
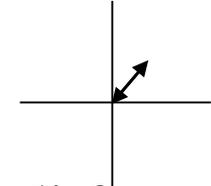


Interferenza di onde elettromagnetiche

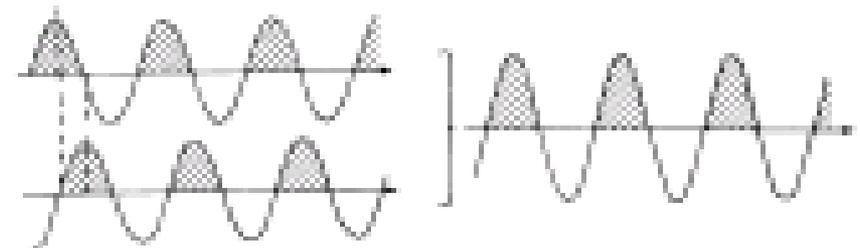
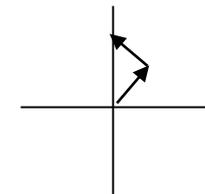
Il risultato della somma di due onde coerenti (stessa frequenza) dipende dalla differenza di fase (Interferenza).



In fase
(interferenza costruttiva)

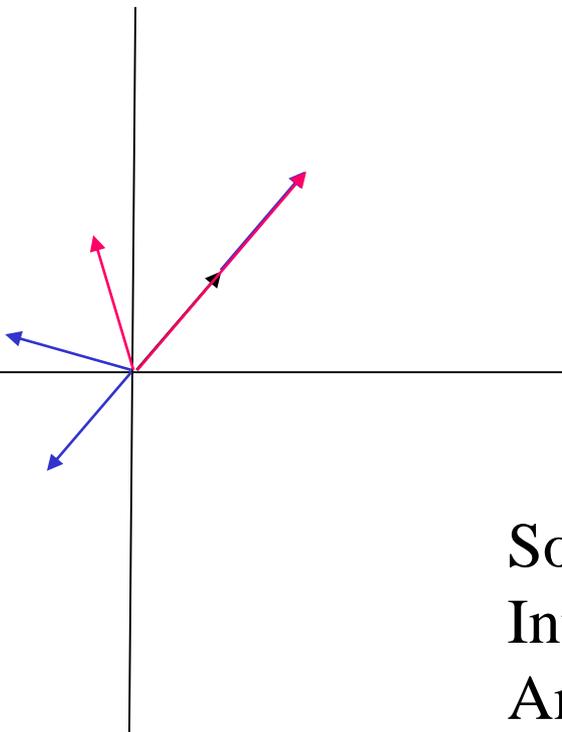


In opposizione di fase
(interferenza distruttiva)



Parzialmente fuori fase

Somma di onde nel diagramma di Argand



Somma di due onde in fase

Interferenza costruttiva

Ampiezza totale $|F|_t = 2|F|$

Somma di due onde non in fase

Interferenza parzialmente distruttiva

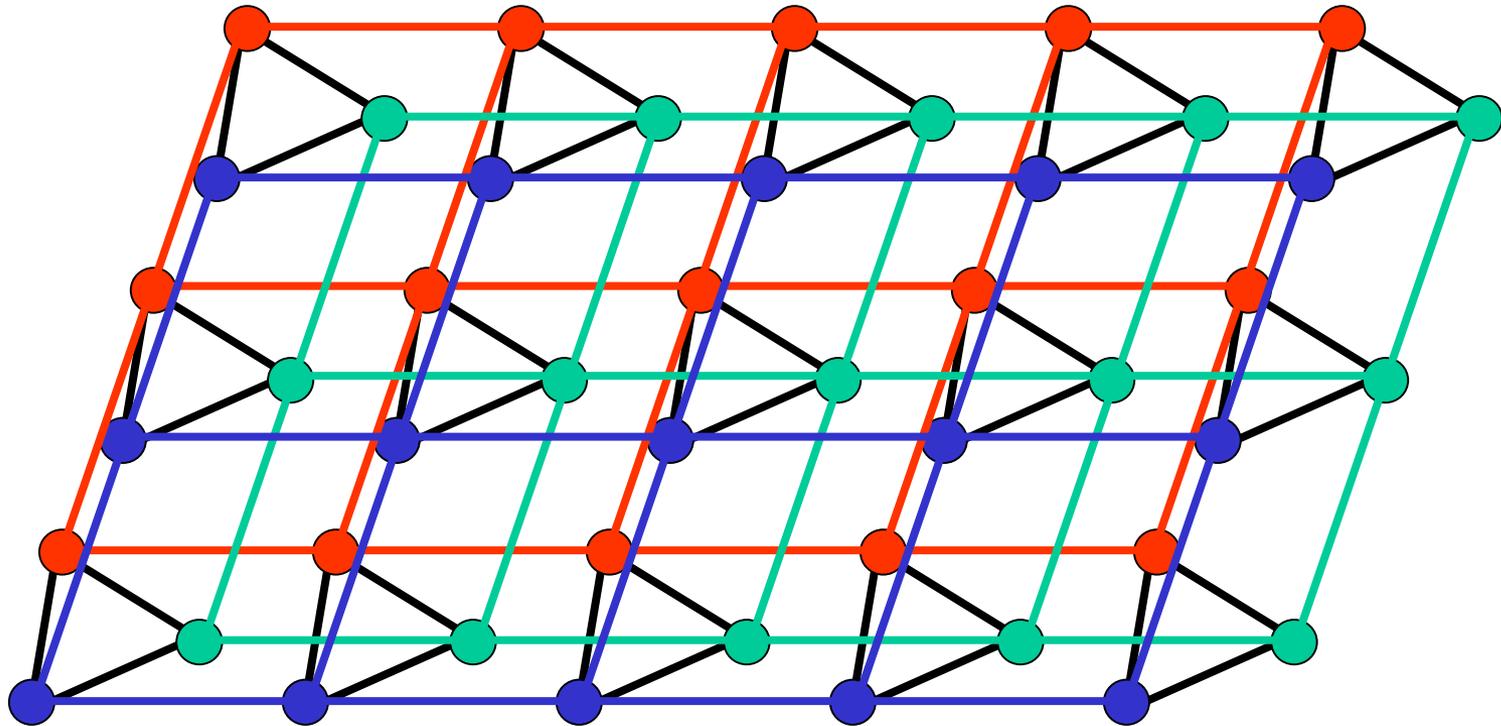
Ampiezza totale $|F|_t < 2|F|$

Somma di due onde in opposizione di fase

Interferenza distruttiva

Ampiezza totale $|F|_t = 0$

Il reticolo cristallino



N atomi in cella

N reticoli compenetrati con ai vertici gli atomi equivalenti per traslazione

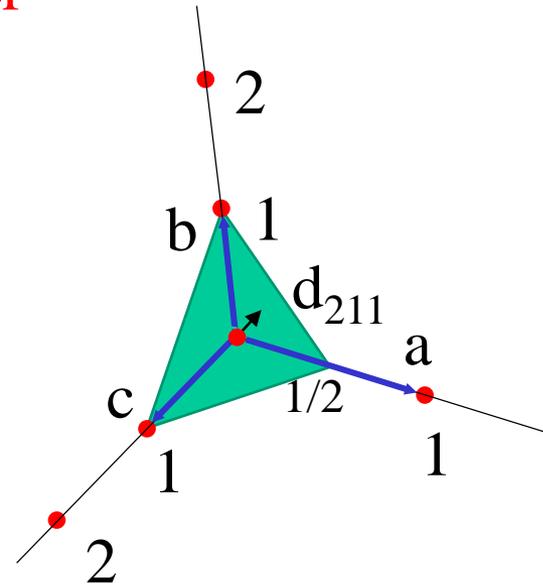
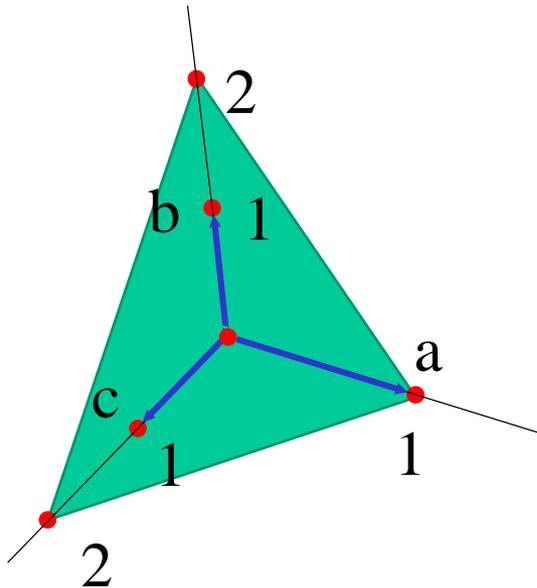
Famiglie di piani reticolari

Tre nodi reticolari non collineari definiscono un piano cristallografico.
La proprietà del reticolo implica che per ogni nodo passa un piano equivalente.
L'insieme di questi piani costituisce una famiglia di piani cristallografici.

Sono paralleli ed equi spaziati da una grandezza costante d (spacing)

I piani reticolari vengono individuati da una terna di numeri interi:

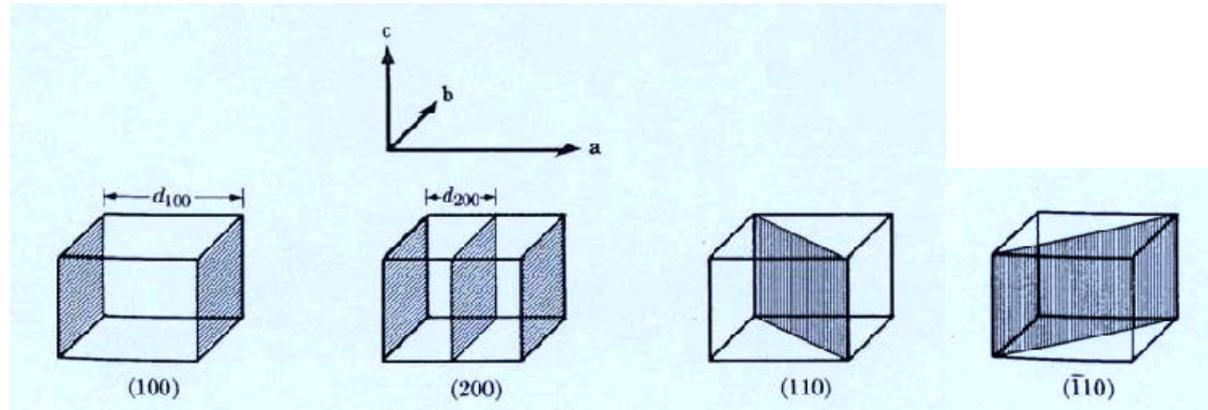
Indici di Miller



Fissata una certa origine esisterà un piano della famiglia di piani con indici di Miller (hkl) a una distanza d_{hkl} dall'origine che intersecherà gli assi della cella cristallografica nelle coordinate a/h , b/k e c/l .

Famiglie di piani e indici di Miller

Nel caso particolare di una famiglia di piani parallela ad un asse, questo piano cristallografico avrà 0 come indice di Miller in quanto l'intercetta rispetto a questo asse è ∞ .



I piani relazionati alle facce di un cristallo sono piani reticolari in senso stretto (cioè i piani che passano per i nodi reticolari) ed hanno come indici di Miller dei numeri interi primi tra loro

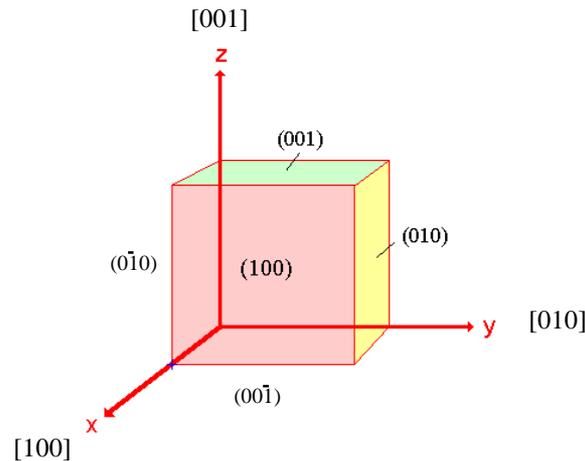
E' tuttavia comodo estendere gli indici di Miller a tutte le terne di numeri interi positivi e negativi (indicati con una barra).

In questo modo si comprendono anche le famiglie di piani che non sono piani reticolari in senso stretto ma sono piani paralleli a piani reticolari con spaziature che sono sottomultipli interi di piani reticolari veri e propri.

NB due famiglie di piani con indici di Miller che differiscono solo dal segno sono la stessa famiglia di piani con la stessa spaziatura vista con direzione opposta

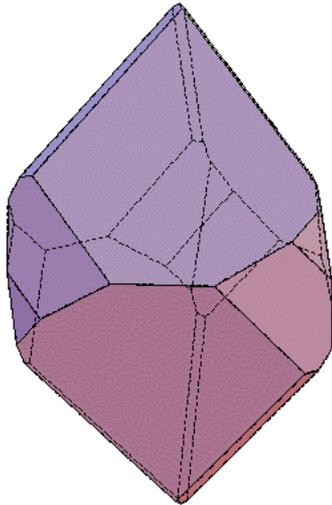
Facce e direzioni nei cristalli

Dal punto di vista formale una famiglia di piani viene solitamente indicata con gli indici hkl senza nessuna parentesi, mentre per indicare una faccia cristallina o la direzione in un cristallo, i tre indici hkl sono chiusi rispettivamente in parentesi tonde (hkl) e in parentesi quadre $[hkl]$.



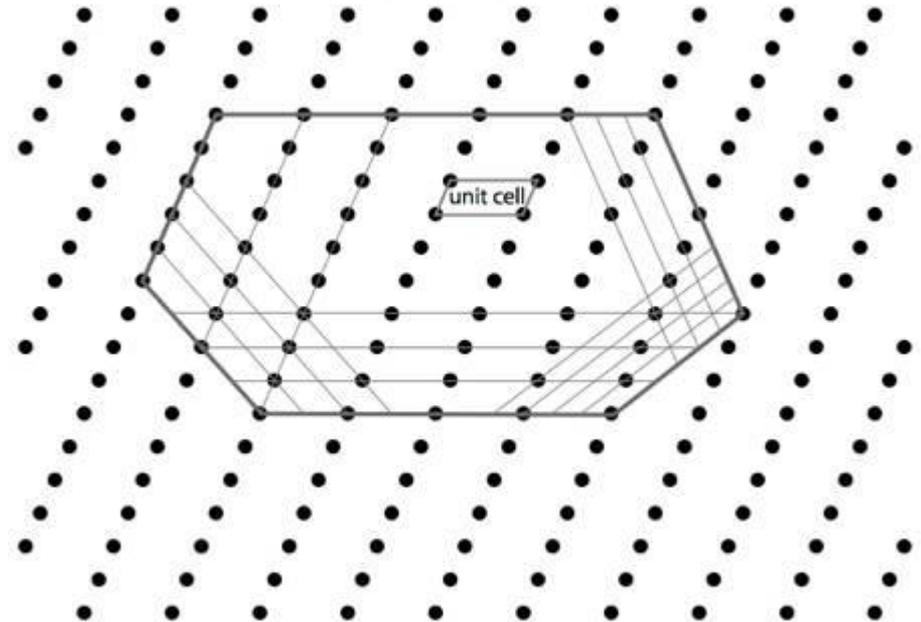
Morfologia dei cristalli e Legge di Bravais

Facce piane e
Spigoli vivi



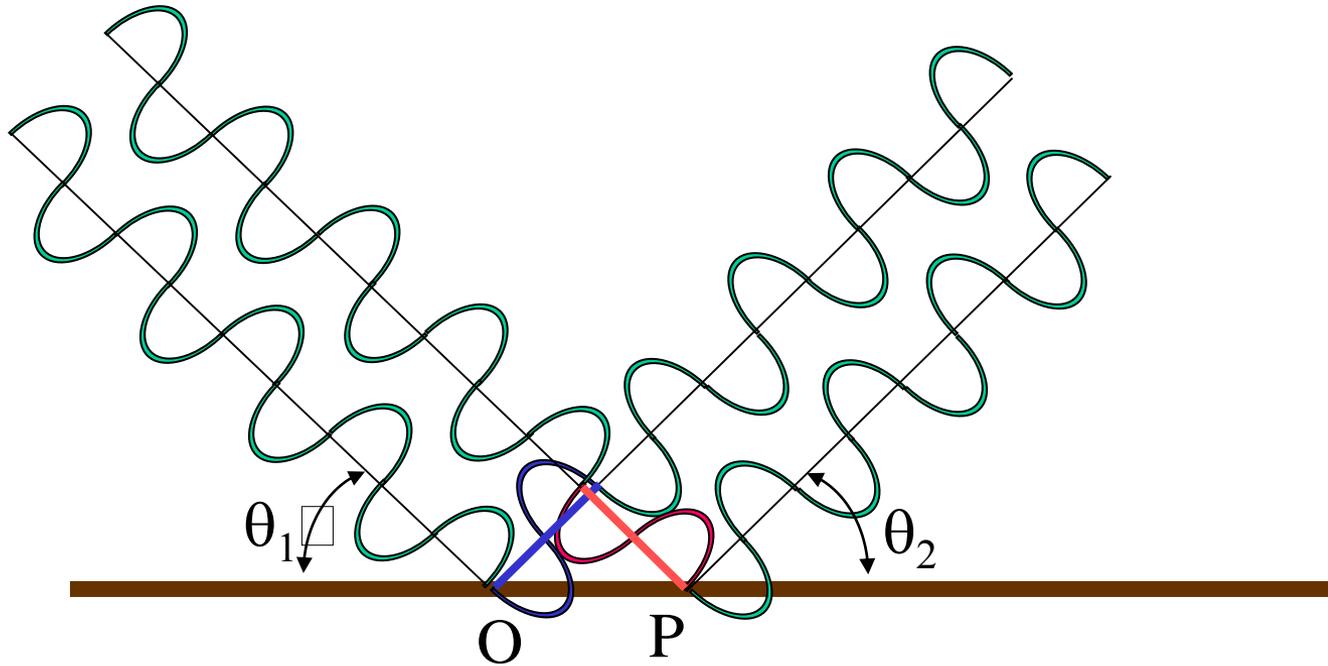
Le facce dei cristalli sono
parallele a piani reticolari
con alta densità di nodi

possible macroscopic crystal shape depending on the lattice periodicity



Interferenza costruttiva

Riflessione

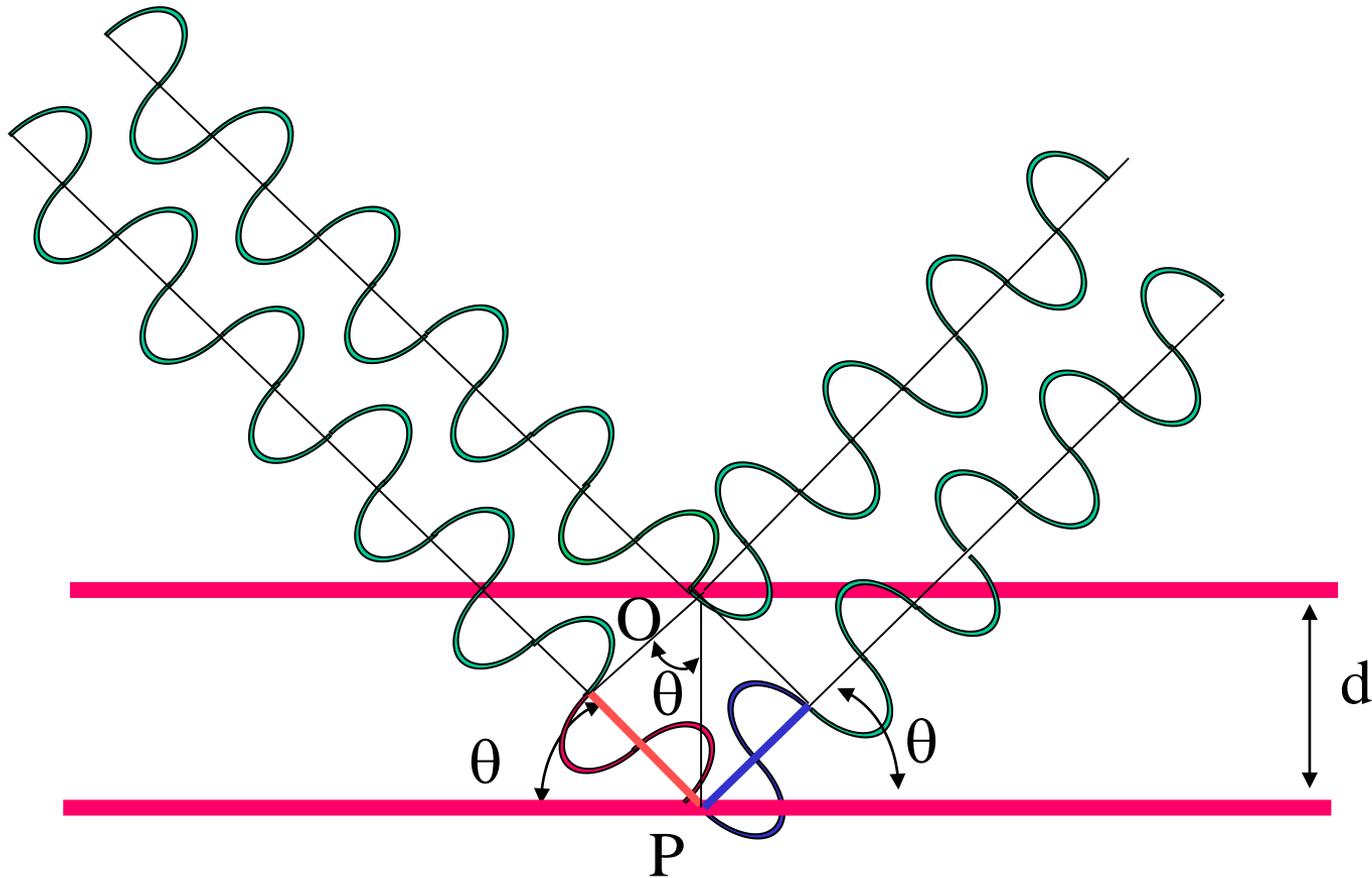


Interferenza costruttiva

cammino ottico = cammino ottico

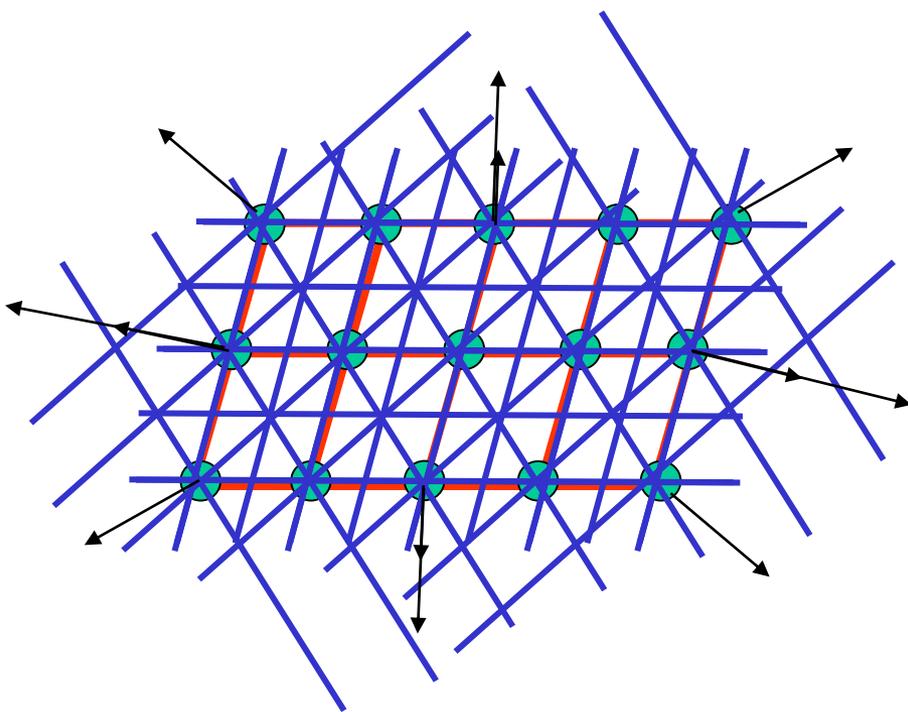
$\theta_1 = \theta_2$ riflessione

Legge di Bragg



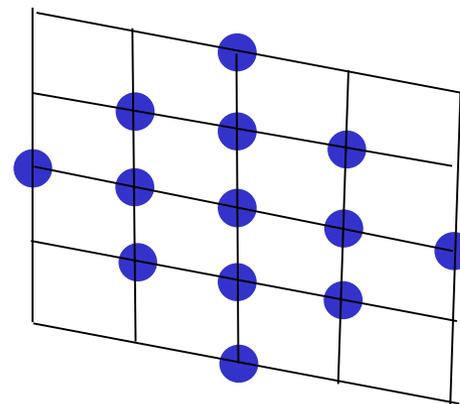
Interferenza costruttiva $2d\sin\theta = n\lambda$

Reticolo Reale



Famiglia di piani 02001

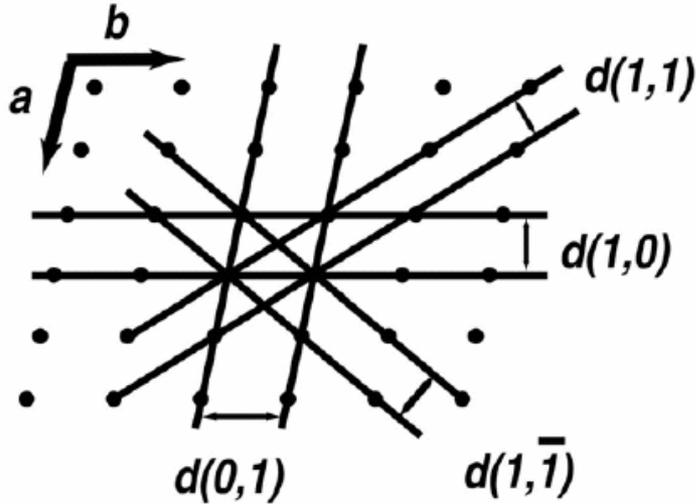
Reticolo Reciproco



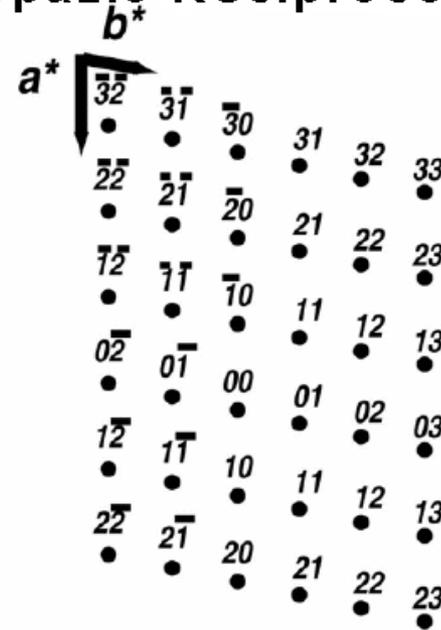
Riflesso 02001

Reticolo diretto e reciproco

Spazio Diretto o Reale (cristallo)



Spazio Reciproco (diffrazione)



$$\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{a} = 1 \quad \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{b} = 0 \quad \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{c} = 0$$

$$\mathbf{b}^* \cdot \mathbf{a} = 0 \quad \mathbf{b}^* \cdot \mathbf{b} = 1 \quad \mathbf{b}^* \cdot \mathbf{c} = 0$$

$$\mathbf{c}^* \cdot \mathbf{a} = 0 \quad \mathbf{c}^* \cdot \mathbf{b} = 0 \quad \mathbf{c}^* \cdot \mathbf{c} = 1$$

$$a^* = 1/a \cdot \cos(\hat{\mathbf{a}}^* \mathbf{a}) = A_{bc} / V_{abc}$$

$$b^* = 1/b \cdot \cos(\hat{\mathbf{b}}^* \mathbf{b}) = A_{ac} / V_{abc}$$

$$c^* = 1/c \cdot \cos(\hat{\mathbf{c}}^* \mathbf{c}) = A_{ab} / V_{abc}$$

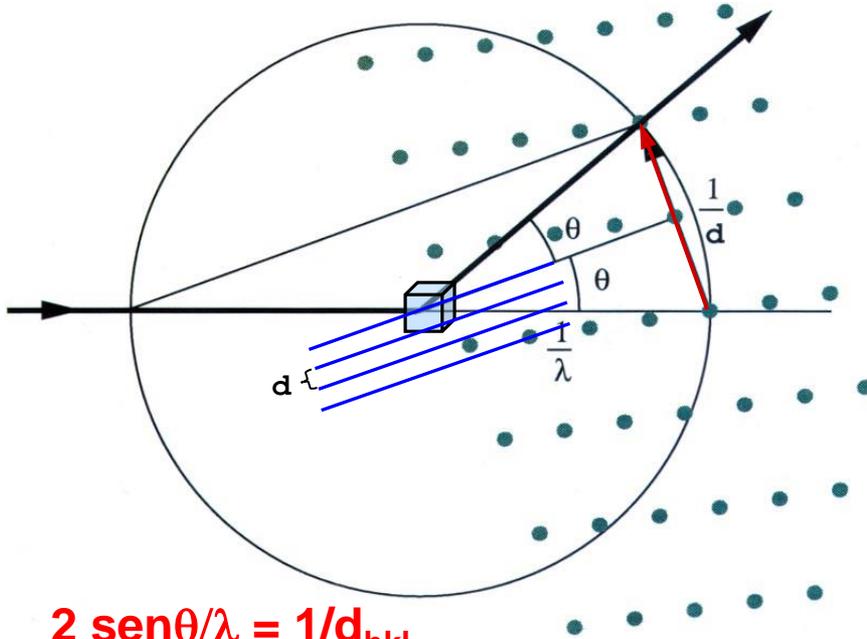
$$\mathbf{a}^* \perp \mathbf{b} \quad \mathbf{a}^* \perp \mathbf{c}$$

$$\mathbf{b}^* \perp \mathbf{a} \quad \mathbf{b}^* \perp \mathbf{c}$$

$$\mathbf{c}^* \perp \mathbf{a} \quad \mathbf{c}^* \perp \mathbf{b}$$

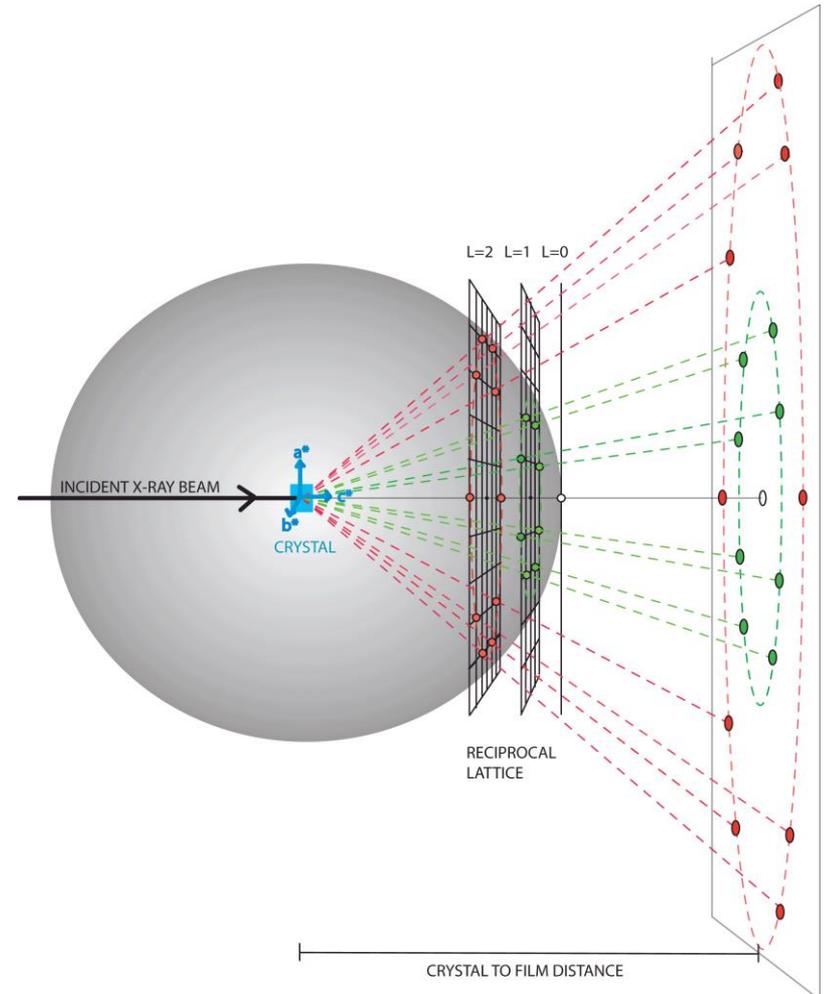
La sfera di Ewald

Il reticolo reciproco è un utile concetto perchè si può mostrare che l'immagine di diffrazione è una proiezione bidimensionale del reticolo reciproco tridimensionale



$$2 \sin\theta/\lambda = 1/d_{hkl}$$

Ogni volta che un punto hkl del reticolo reciproco interseca la sfera di Ewald, si origina un raggio diffratto hkl .



Legge di Bragg ed indici di Miller

Interferenza costruttiva

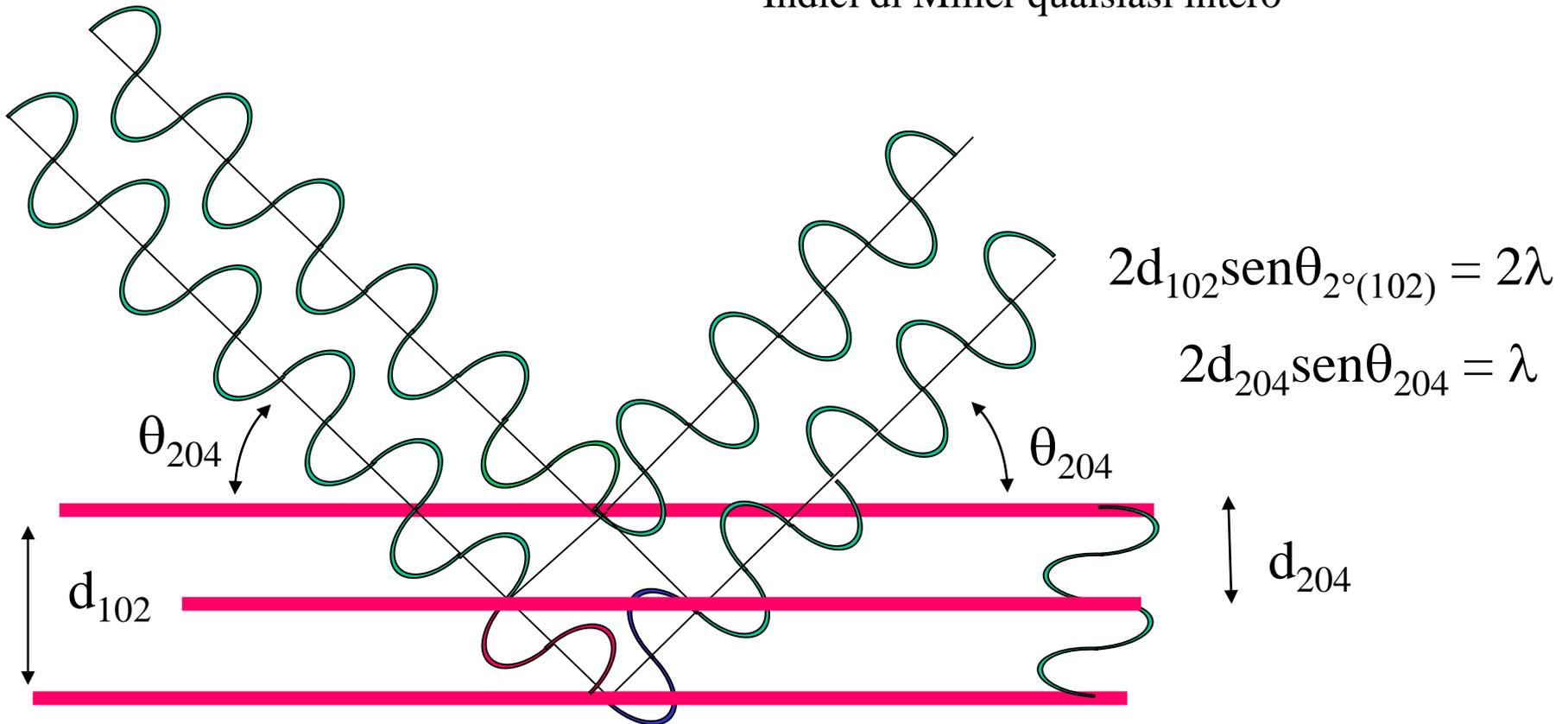
$$2d_{hkl} \sin \theta_{n(hkl)} = n\lambda$$

Piani reticolari in senso stretto
n=ordine del riflesso

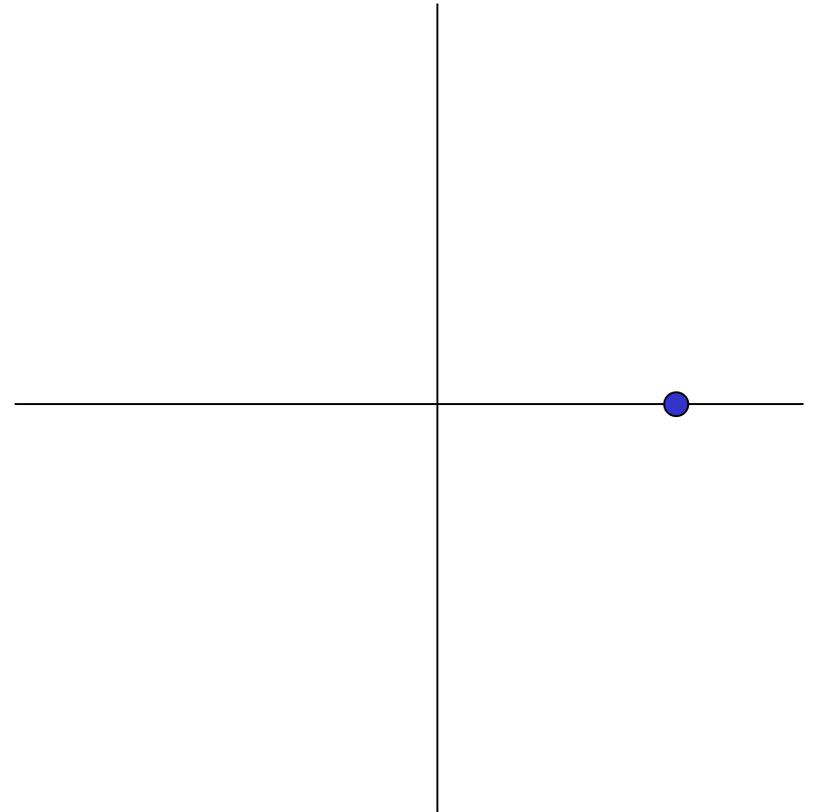
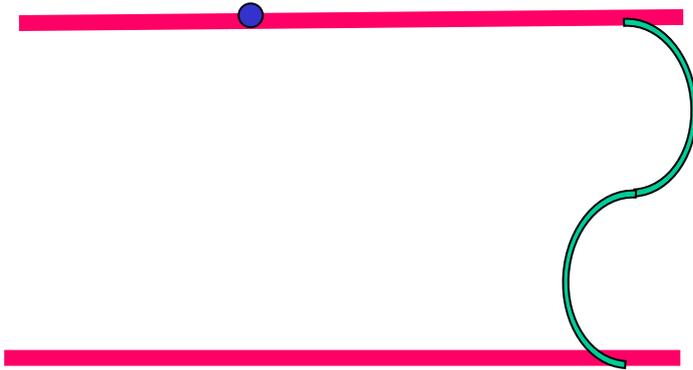
$$2d_{n(hkl)} \sin \theta_{n(hkl)} = \lambda$$

$$2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} = \lambda$$

Indici di Miller qualsiasi intero



Origine e fase nel diagramma di Argan



L'origine viene scelta per convenzione su un elemento di simmetria

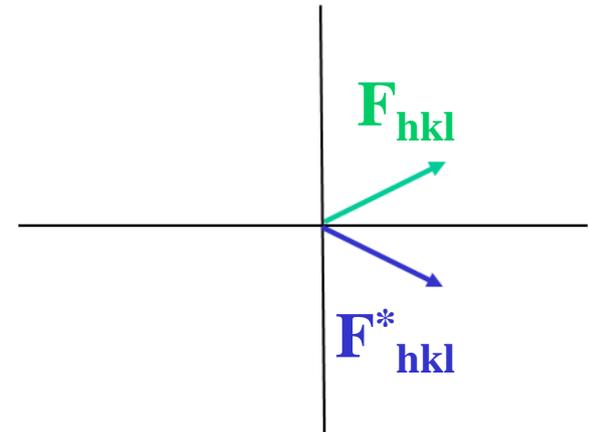
Fattore di struttura

L'onda risultante dallo diffrazione di una famiglia di piani hkl è rappresentata dal fattore di struttura \mathbf{F}_{hkl}

Il fattore di struttura è un numero complesso
la cui fase dipende dalla scelta dell'origine

L'intensità di diffrazione

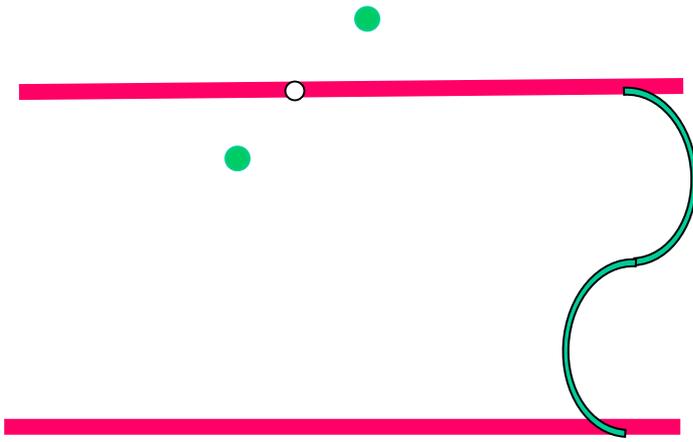
$$I_{hkl} = \mathbf{F}_{hkl} \cdot \mathbf{F}_{hkl}^* = |\mathbf{F}_{hkl}|^2$$



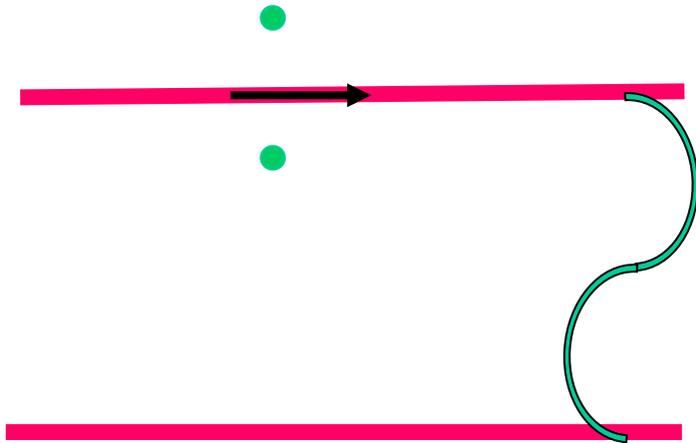
\mathbf{F}_{hkl}^* è il complesso coniugato di \mathbf{F}_{hkl} : $|\mathbf{F}_{hkl}^*| = |\mathbf{F}_{hkl}|$ $\phi_{hkl}^* = -\phi_{hkl}$

Il prodotto di due numeri complessi ha come modulo il prodotto dei moduli e come fase la somma delle fasi

Riflessi con fase ristretta

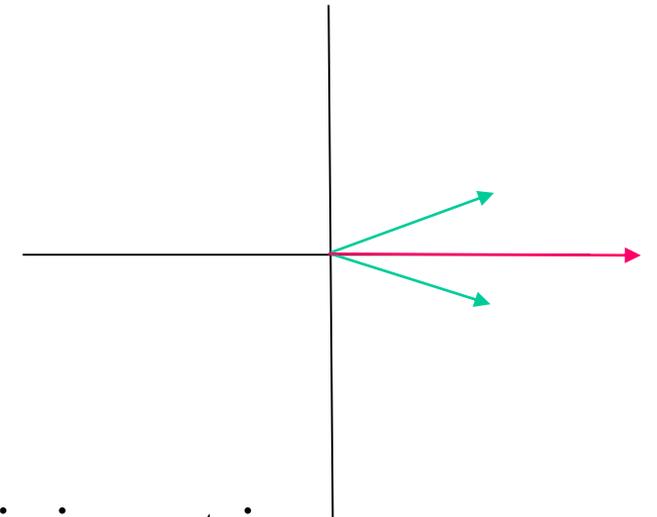
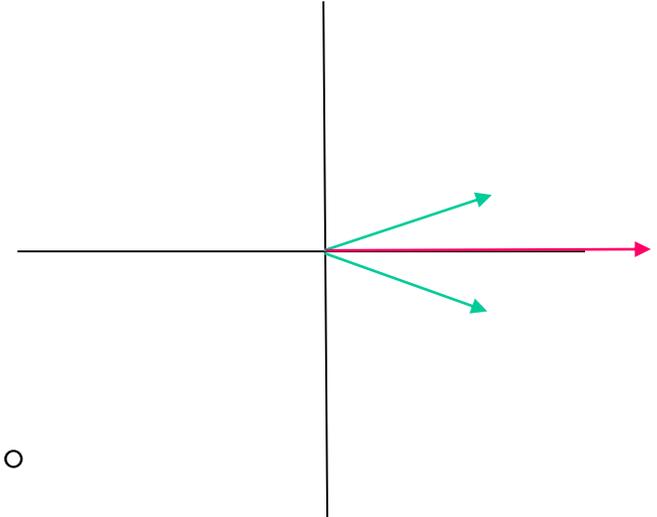


strutture centrosimmetriche: fasi = 0 o 180°

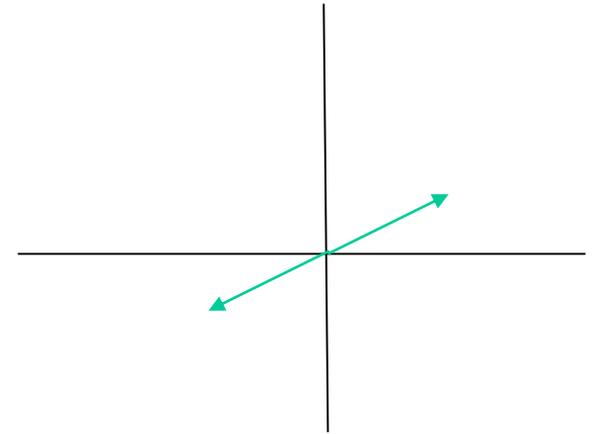
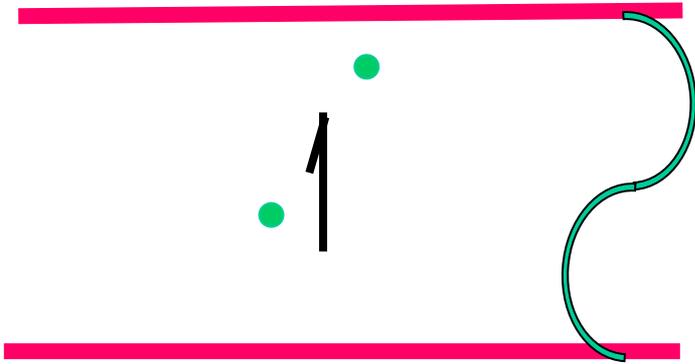


riflessi di famiglie di piani paralleli ad assi di simmetria

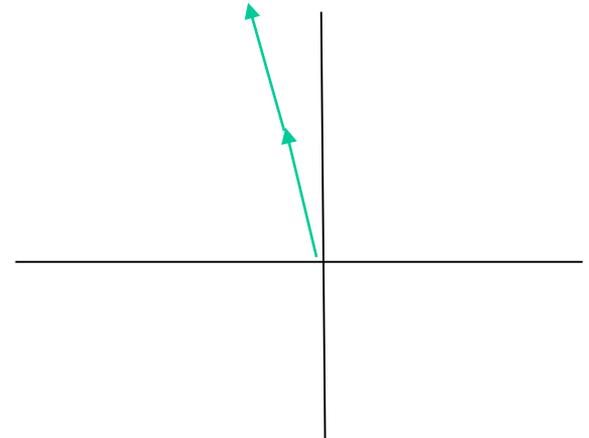
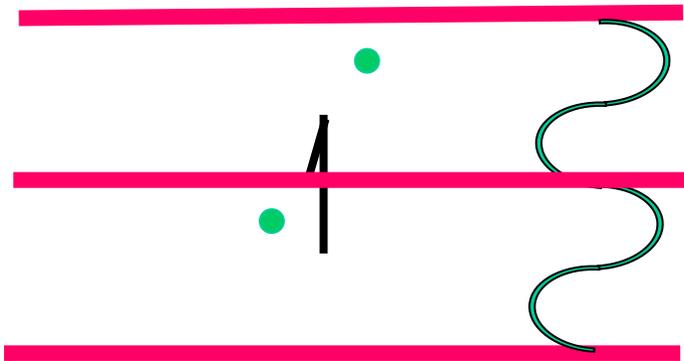
hanno fasi ristrette: ad esempio i riflessi $h0l$ del sistema monoclinico



Assenze sistematiche

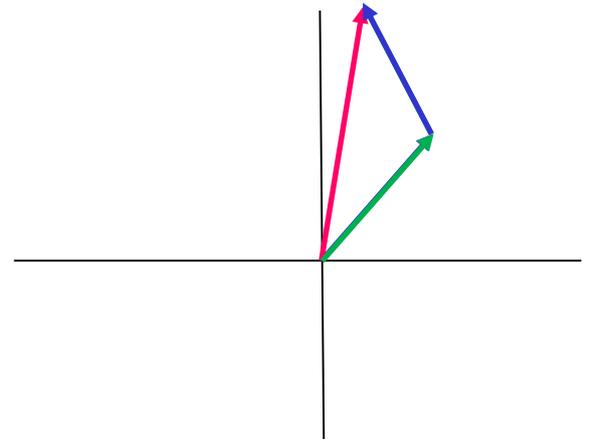
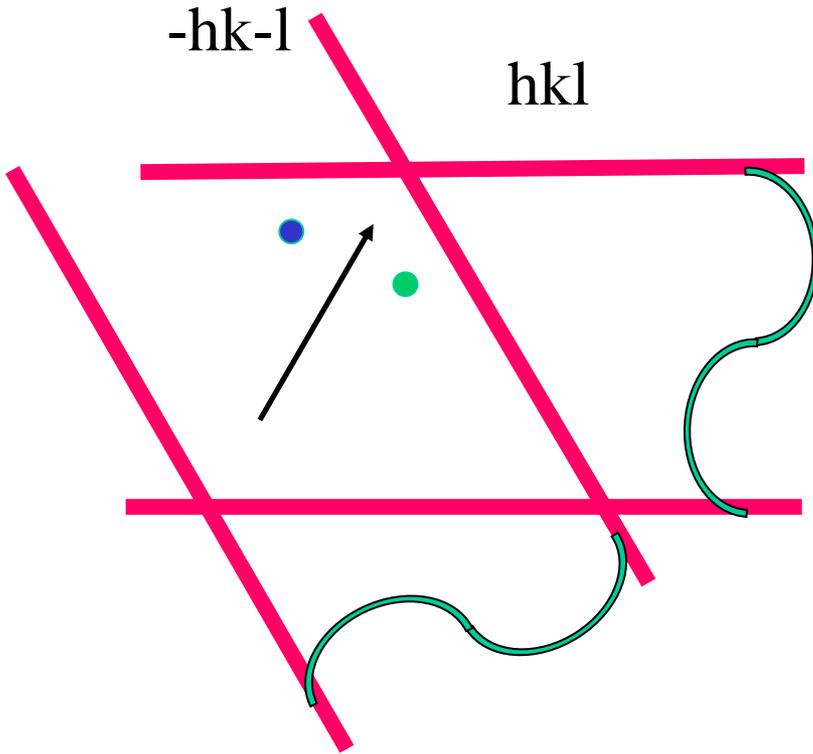


Riflessi di piani posti ortogonalmente rispetto ad una traslazione di $\frac{1}{2}$ di ordine dispari hanno intensità nulla: es. $0k0$ con $k=2n+1$ in $P2_1$



Riflessi di piani posti ortogonalmente rispetto ad una traslazione di $\frac{1}{2}$ di ordine pari hanno intensità molto elevata: es. $0k0$ con $k=2n$ in $P2_1$

Simmetria nella diffrazione



nel sistema monoclinico i riflessi hkl hanno lo stesso fattore di struttura dei riflessi $-hk-l$

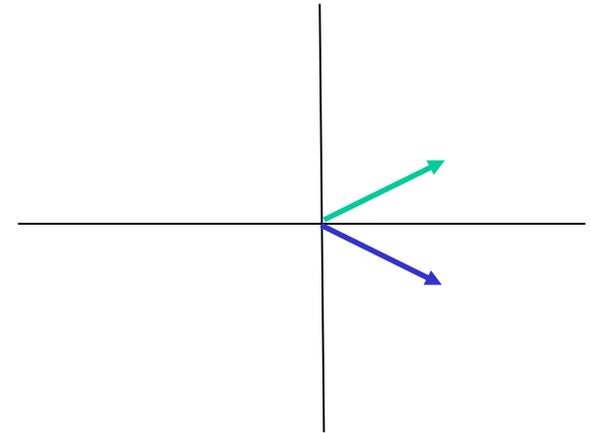
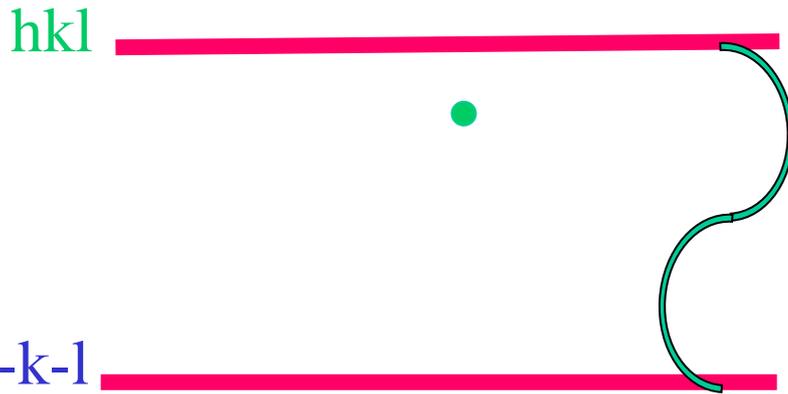
nel sistema ortorombico $F_{hkl}=F_{h-k-l}=F_{-hk-l}=F_{-h-kl}$

nel sistema tetragonale si aggiunge lo scambio degli indici $F_{hkl}=F_{khl}$

Simmetria della diffrazione in una delle 32 classi cristalline

Legge di Friedel

Se le specie atomiche di cui è formato il cristallo non introducono una variazione di fase relativa dovuta allo scattering (fattore di scattering senza componente immaginaria o cristalli formati da una sola specie chimica)



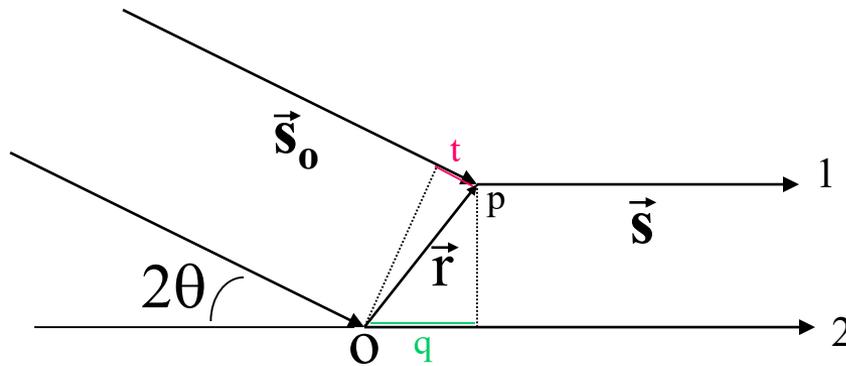
$$|F_{hkl}| = |F_{-h-k-l}| \quad \phi_{hkl} = -\phi_{-h-k-l} \quad F_{-h-k-l} = F_{hkl}^*$$

$$F_{hkl}^2 = F_{hkl} * F_{hkl}^* = I_{hkl} \quad \mathbf{I_{hkl} = I_{-h-k-l}}$$

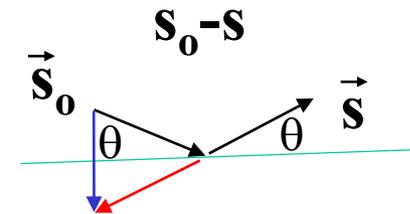
Trascurando le piccole differenze di fase dovute allo scattering anomalo nelle intensità di diffrazione è sempre presente il centro di simmetria

Simmetria di diffrazione nelle 11 classi Laue

Lo Scattering di un atomo



$$|\mathbf{s}_0 - \mathbf{s}| = 2\text{sen}\theta$$



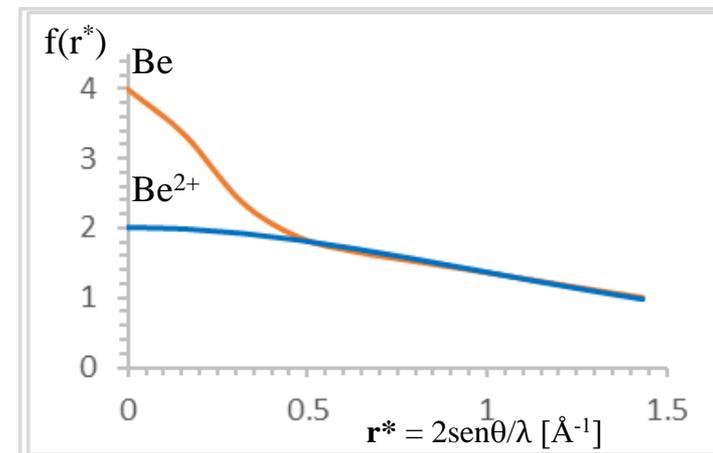
L'onda scatterata nel punto p (individuato dal vettore \mathbf{r}) da un volume infinitesimo dv con densità elettronica $\rho(\mathbf{r})$ avrà ampiezza $\rho(\mathbf{r})dv$ (elettroni presenti nel volume infinitesimo dv) e fase ϕ relativa all'origine O, che dipenderà dalla differenza di cammino ottico $t - q = \mathbf{r} \cdot \mathbf{s}_0 - \mathbf{r} \cdot \mathbf{s}$ (\mathbf{s}_0 e \mathbf{s} versori delle direzioni del fascio incidente e scatterato), uguale a $\mathbf{r} \cdot (\mathbf{s}_0 - \mathbf{s}) \cdot 2\pi/\lambda$. Ponendo $\mathbf{r}^* = (\mathbf{s}_0 - \mathbf{s})/\lambda$, l'onda scatterata dal punto p all'angolo 2θ sarà quindi: $\rho(\mathbf{r})\exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{r}^*)dv$. Il totale dell'onda scatterata da un atomo è dato dall'integrale dello scattering dei punti individuati dal vettore \mathbf{r} su tutto il volume dell'atomo :

$$f(\mathbf{r}^*) = \int_{\text{vol.atomo}} \rho(\mathbf{r})\exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{r}^*)dv$$

Per simmetria sferica $f(\mathbf{r}^*) = f(|\mathbf{r}^*|)$ ed $|\mathbf{r}^*| = |\mathbf{s}_0 - \mathbf{s}|/\lambda = 2\text{sen}\theta/\lambda$

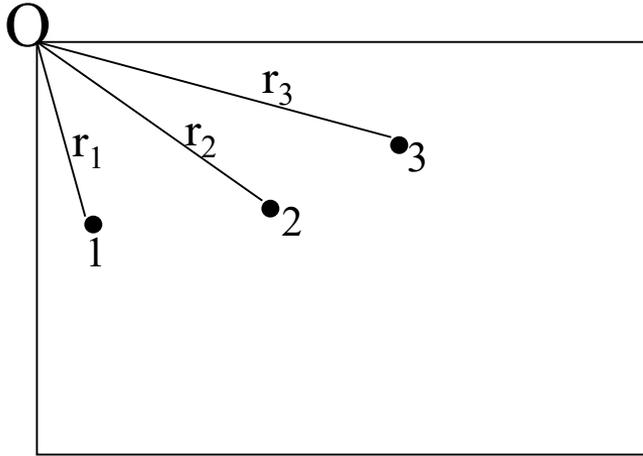
Per $\mathbf{r}^* = 0$, $f(0) = Z$ il numero di elettroni dell'atomo.

Il fattore atomico di scattering (fattore di forma), $f(\mathbf{r}^*)$ è la trasformata di Fourier della densità elettronica dell'atomo, $\rho(\mathbf{r})$



Lo Scattering dell'unità cristallograficamente indipendente

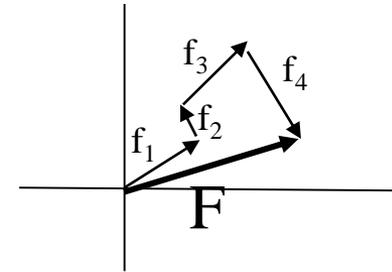
(risultato dell'interferenza dei N reticoli compenetrati definiti da N atomi non relazionati da simmetria)



Lo Scattering dell'atomo 1 è $\mathbf{f}_1 = f_1 \exp(2\pi i \mathbf{r}_1 \cdot \mathbf{r}^*)$ dove f_1 è fattore atomico di scattering per l'atomo 1

Totale dell'onda scatterata $\mathbf{F}(\mathbf{r}^*) = \mathbf{f}_1 + \mathbf{f}_2 + \mathbf{f}_3 + \dots + \mathbf{f}_N$

$\mathbf{F}(\mathbf{r}^*) = \sum f_j \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{r}^*)$
sommatoria j da 1 a N

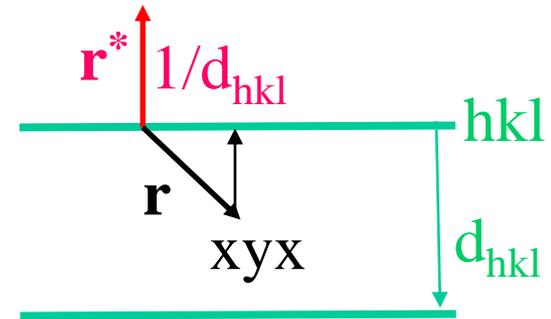


\mathbf{r} nello spazio reale della cella con coordinate frazionarie x,y,z

\mathbf{r}^* nello spazio reciproco con coordinate h,k,l

$\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}^* =$ distanza del punto xyz dal piano hkl / d_{hkl}

$2\pi \mathbf{r} \cdot \mathbf{r}^* = \phi$ fase dell'onda scatterata dal punto xyz
rispetto al piano hkl



$$\mathbf{r} \cdot \mathbf{r}^* = hx + ky + lz$$

Rappresentazione del Fattore di struttura

Cella unitaria

$$F(h,k,l) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x,y,z) \cdot \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] \cdot dx dy dz$$

↑
Un riflesso

↑
Densità elettronica

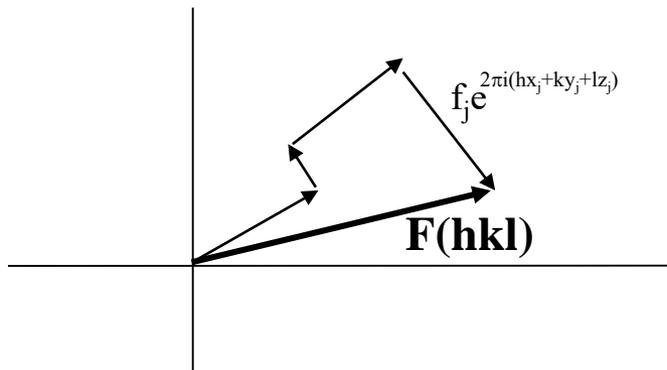
TRASFORMATA DI FOURIER

$$F(h,k,l) = \sum_j f_j \exp[2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)]$$

$$= |F(hkl)| \exp[i\phi(hkl)] = A(hkl) + iB(hkl)$$

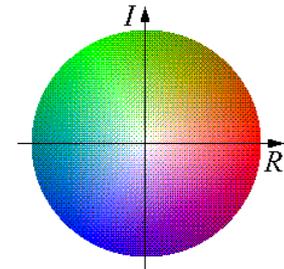
$|F(hkl)|$ è l'ampiezza e $\phi(hkl)$ è la fase

Ciascun fattore di struttura è la somma vettoriale dello scattering dei singoli atomi



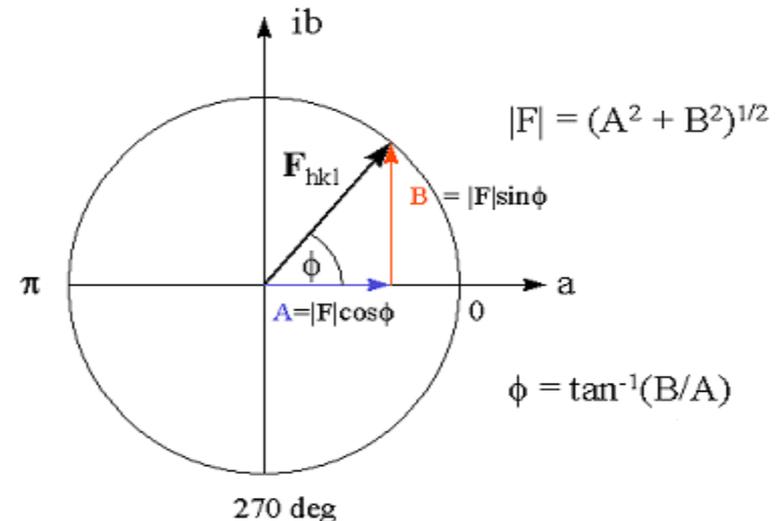
$|F|$ intensità

Φ colore



<http://www.ytbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html>

Diagramma di Argand



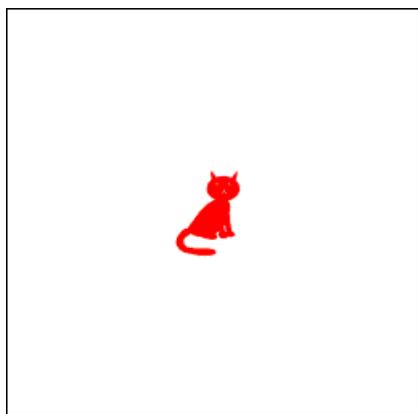
Densità elettronica

ANTITRASFORMATA DI FOURIER DEI FATTORI DI STRUTTURA

SINTESI DI FOURIER : $F \Rightarrow \rho$

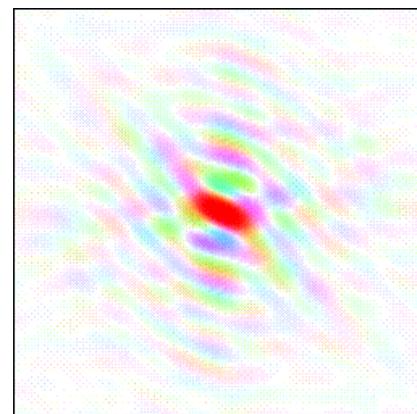
$$\rho(xyz) = (1/V) \sum_h \sum_k \sum_l |F(\underline{hkl})| \exp[-2\pi i(hx+ky+lz) - \phi(\underline{hkl})]$$

SPAZIO DIRETTO



DENSITA' ELETTRONICA

SPAZIO RECIPROCO



FATTORI DI STRUTTURA



Trasformata
di Fourier

Problema della fase

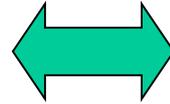
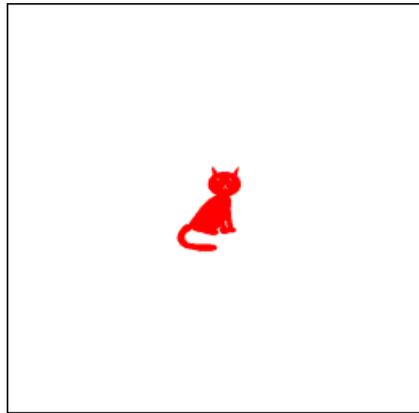
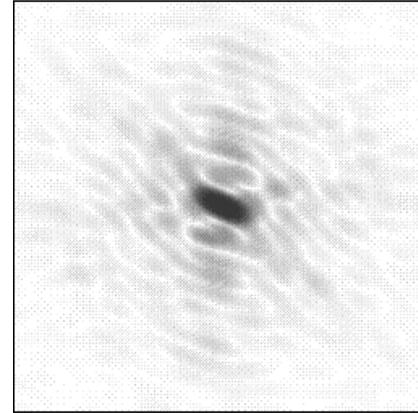
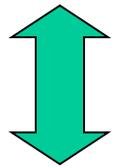


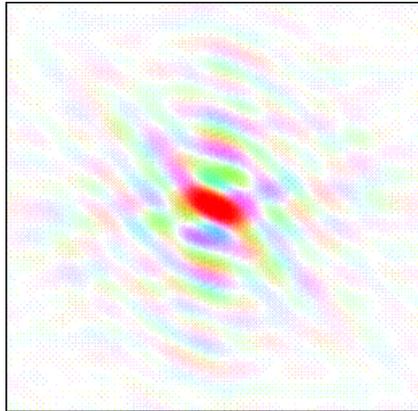
Immagine
di diffrazione



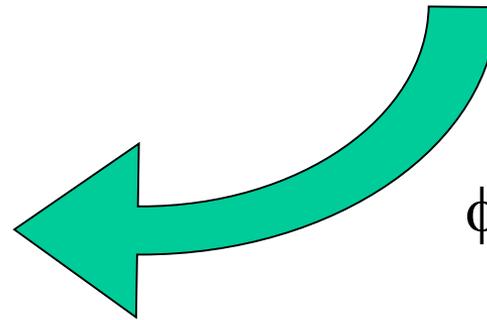
$|F|(\text{gatto})$



Trasformata
di Fourier

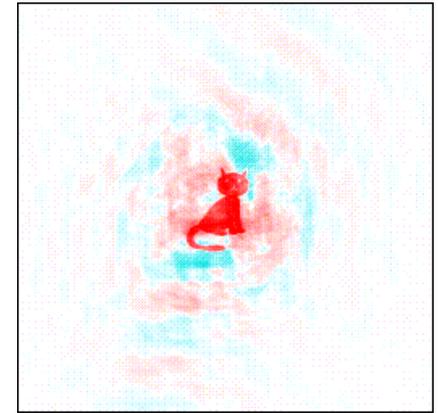
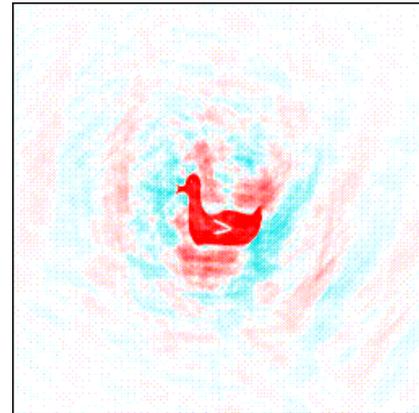
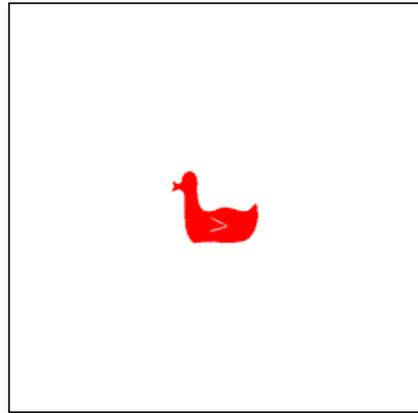
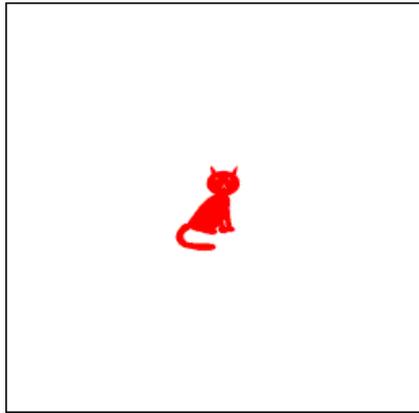


$|F|(\text{gatto}), \phi(\text{gatto})$

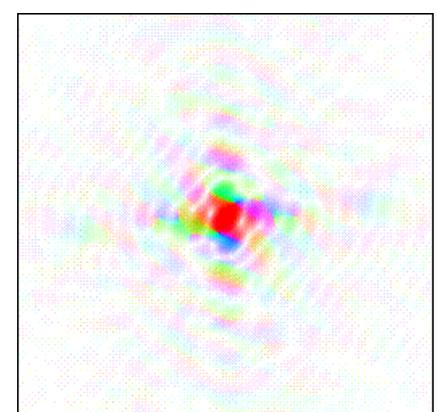
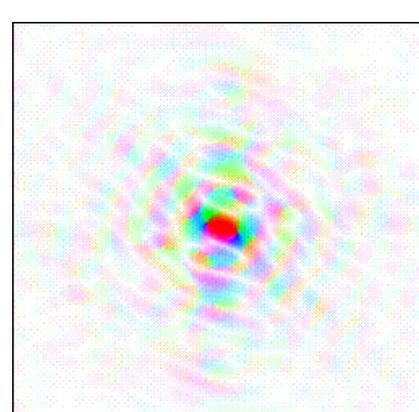
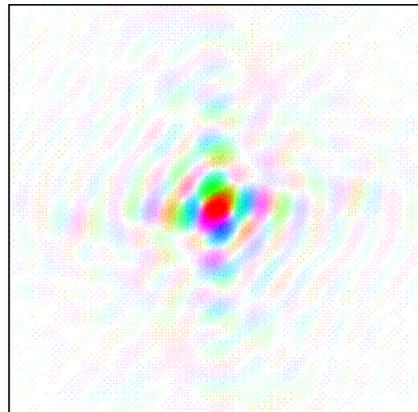
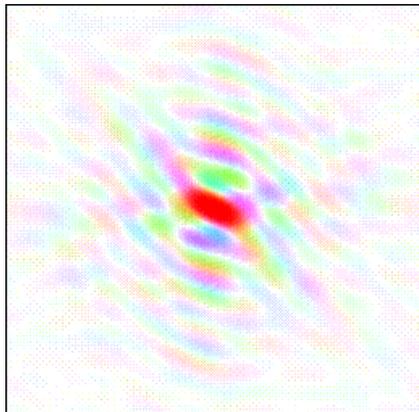


$\phi(\text{gatto}) ?$

Importanza relativa della fase ed ampiezza



↑
Trasformata
di Fourier
↓



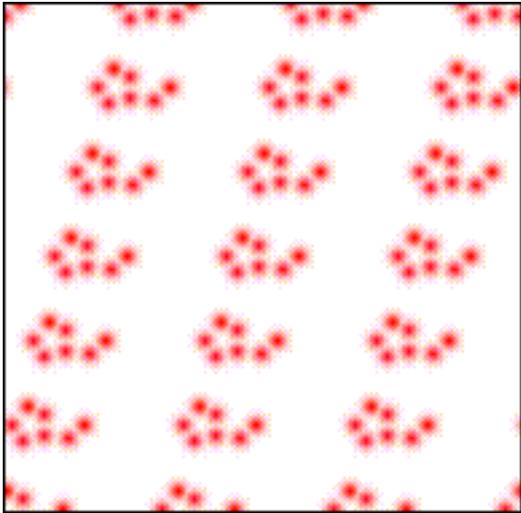
$|F|(\text{gatto}), \phi(\text{gatto})$

$|F|(\text{papera}), \phi(\text{papera})$

$|F|(\text{gatto}), \phi(\text{papera})$

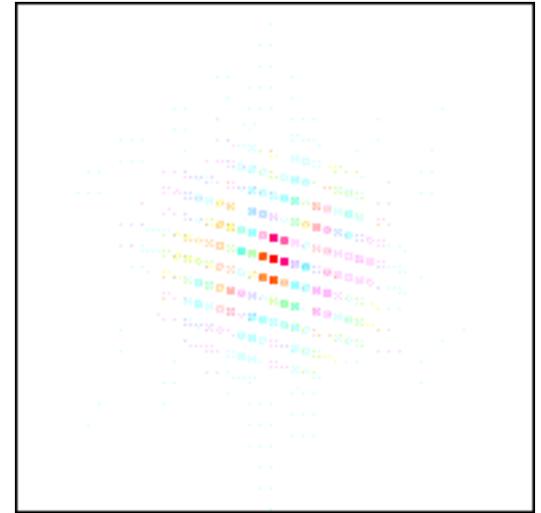
$|F|(\text{papera}), \phi(\text{gatto})$

SPAZIO DIRETTO



DENSITA' ELETTRONICA

SPAZIO RECIPROCO



FATTORI DI STRUTTURA

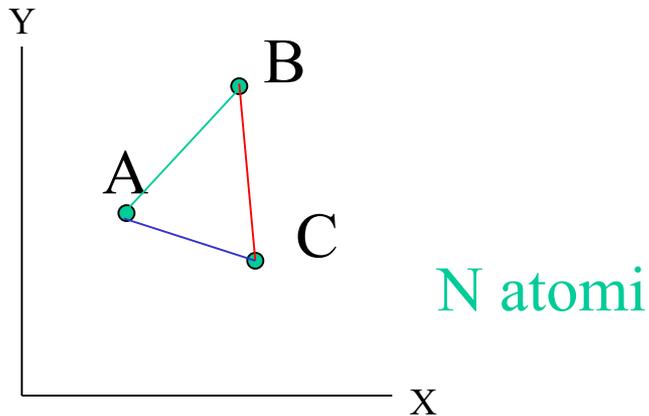


Trasformata
di Fourier

La funzione Patterson

$$P(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l I(hkl) \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)]$$

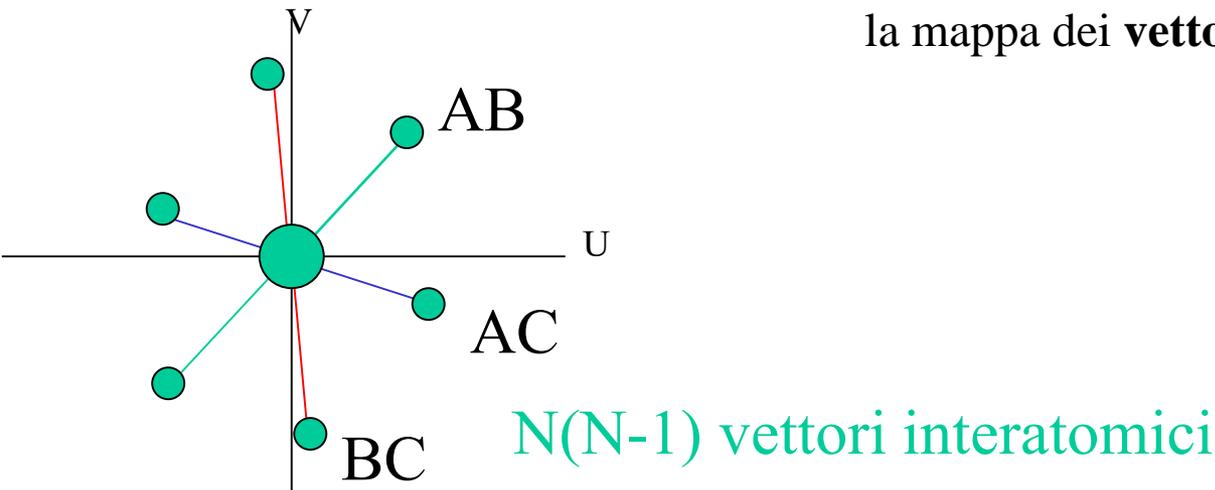
“Struttura”



- La funzione Patterson è la trasformata di Fourier dell'intensità di diffrazione

- La Patterson può essere calcolata direttamente dalle intensità misurate senza conoscere la fase

“Patterson”



- I massimi della funzione Patterson rappresentano la mappa dei **vettori interatomici** della struttura

Risoluzione del problema della fase mediante metodo dell'atomo pesante

Nel caso di complessi metallici e più in generale di cristalli con atomi con molti elettroni di core si può risolvere il problema della fase mediante il metodo dell'atomo pesante interpretando la funzione Patterson i cui massimi sono dominati dai vettori interatomici atomo pesante – atomo pesante

Interpretazione della Patterson

Gruppo spaziale $P2_12_12_1$

1 atomo indipendente

4 atomi in cella

Posizioni Equivalenti

x, y, z

$-x+1/2, -y, z+1/2$

$-x, y+1/2, -z+1/2$

$x+1/2, -y+1/2, -z$

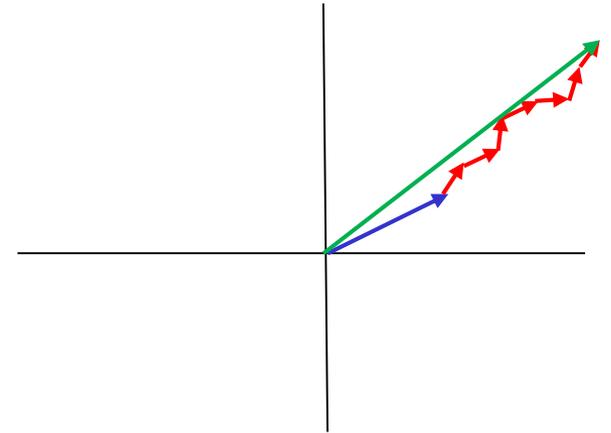
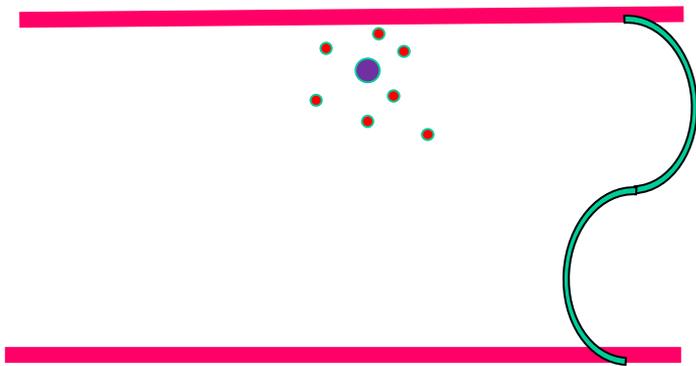
Patterson Teorica

	x,y,z	$-x+1/2,-y,z+1/2$	$-x,y+1/2,-z+1/2$	$x+1/2,-y+1/2,-z$
x,y,z	$0,0,0$	$-2x+1/2,-2y,1/2$	$-2x,1/2,-2z+1/2$	$1/2,-2y+1/2,-2z$
$-x+1/2,-y,z+1/2$	$2x-1/2,2y,-1/2$	$0,0,0$	$-1/2,2y+1/2,-2z$	$2x,1/2,-2z-1/2$
$-x,y+1/2,-z+1/2$	$2x,-1/2,2z-1/2$	$1/2,-2y-1/2,2z$	$0,0,0$	$2x+1/2,-2y,-1/2$
$x+1/2,-y+1/2,-z$	$-1/2,2y-1/2,2z$	$-2x,-1/2,2z+1/2$	$-2x-1/2,2y,1/2$	$0,0,0$

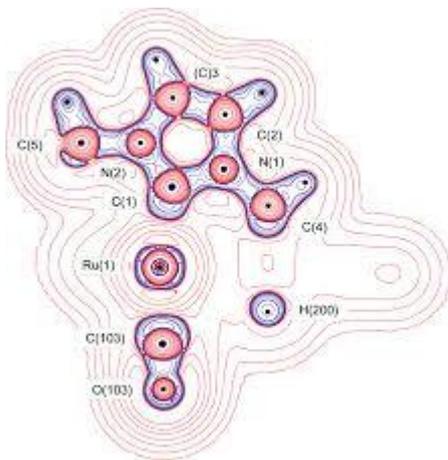
Interpretazione dalle Mappe Pattersons

Se il numero di atomi pesanti da localizzare è piccolo, i siti possono essere trovati direttamente usando l'arcana magia delle sezioni di Harker

Dalla posizione dell'atomo pesante si può calcolare il suo contributo al fattore di struttura (modulo e fase)



Con le fasi si possono calcolare le mappe di densità elettronica
Dalle quali si possono localizzare gli altri atomi della struttura



Le nuove fasi saranno migliori delle precedenti e la nuova mappa sarà più pulita.
Si potranno localizzare nuovi atomi.

Cicli interattivi fino al completamento della struttura

Risoluzione del problema della fase mediante metodi diretti

Metodi che derivano le fasi direttamente dalle intensità di diffrazione per mezzo di relazioni probabilistiche.

Le fasi sono derivate dall'ampiezza dei fattori di struttura normalizzati (E_{hkl}) rispetto ad una distribuzione casuale di atomi nella cella unitaria.

La densità elettronica $\rho(x,y,z)$ ha la proprietà di essere positiva e concentrata in prossimità dei nuclei con valori quasi zero altrove.

Equazione di Sayre

$$E_{hkl} = k \sum E_{h'k'l'} E_{h-h'k-k'l-l'}$$

Dall'equazione di Sayre considerando delle triplette di riflessi forti che dominano la sommatoria si ottiene delle relazioni tra le fasi dei riflessi:

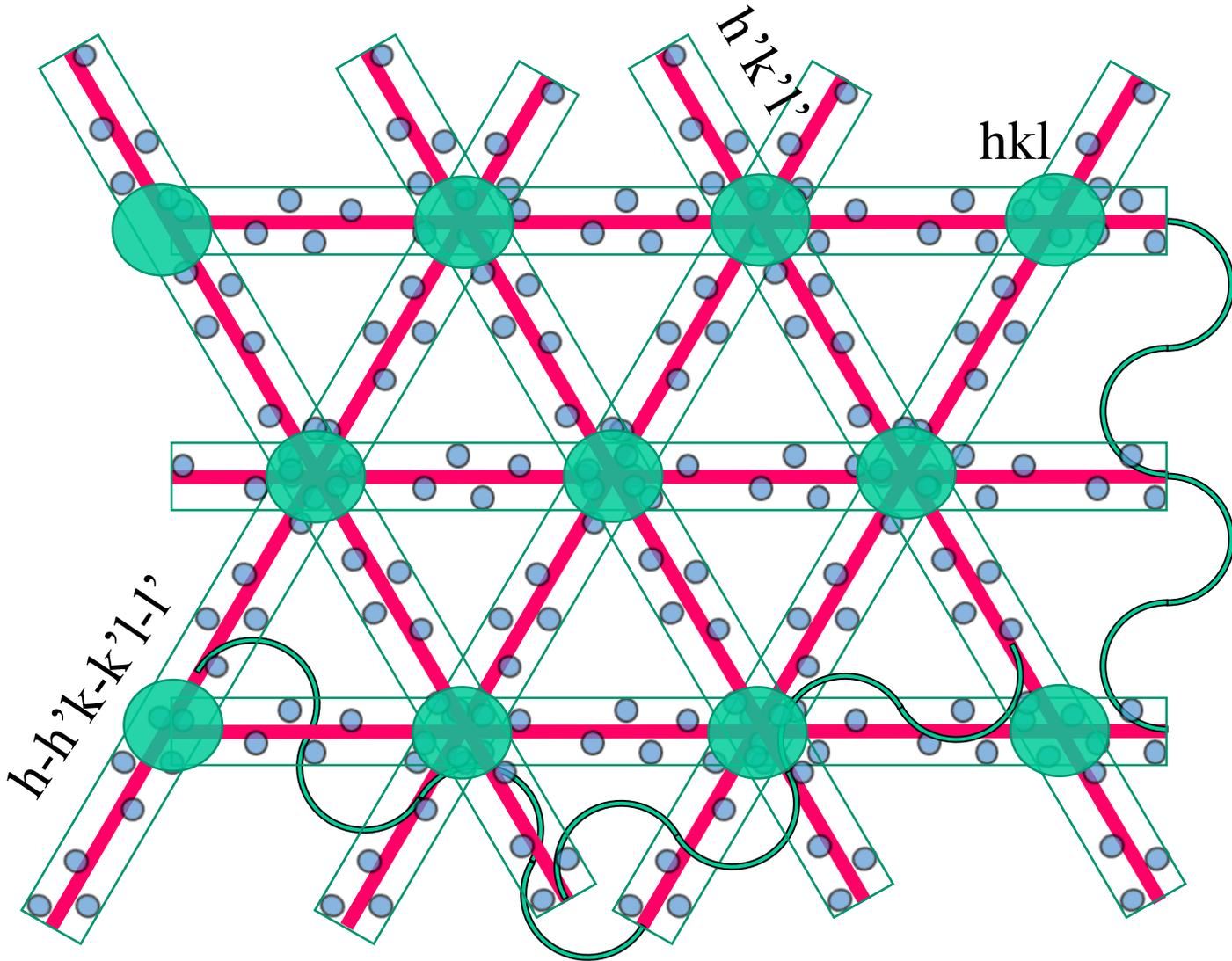
$$\varphi_{hkl} \approx \varphi_{h'k'l'} + \varphi_{h-h'k-k'l-l'}$$

Considerando un piccolo insieme di riflessioni al quale viene assegnato un set di fasi casuali, le fasi vengono estese a tutte le riflessioni in modo consistente con le relazioni delle triplette.

Utilizzando delle figure di merito si seleziona la soluzione che porta a rispettare le proprietà della densità elettronica.

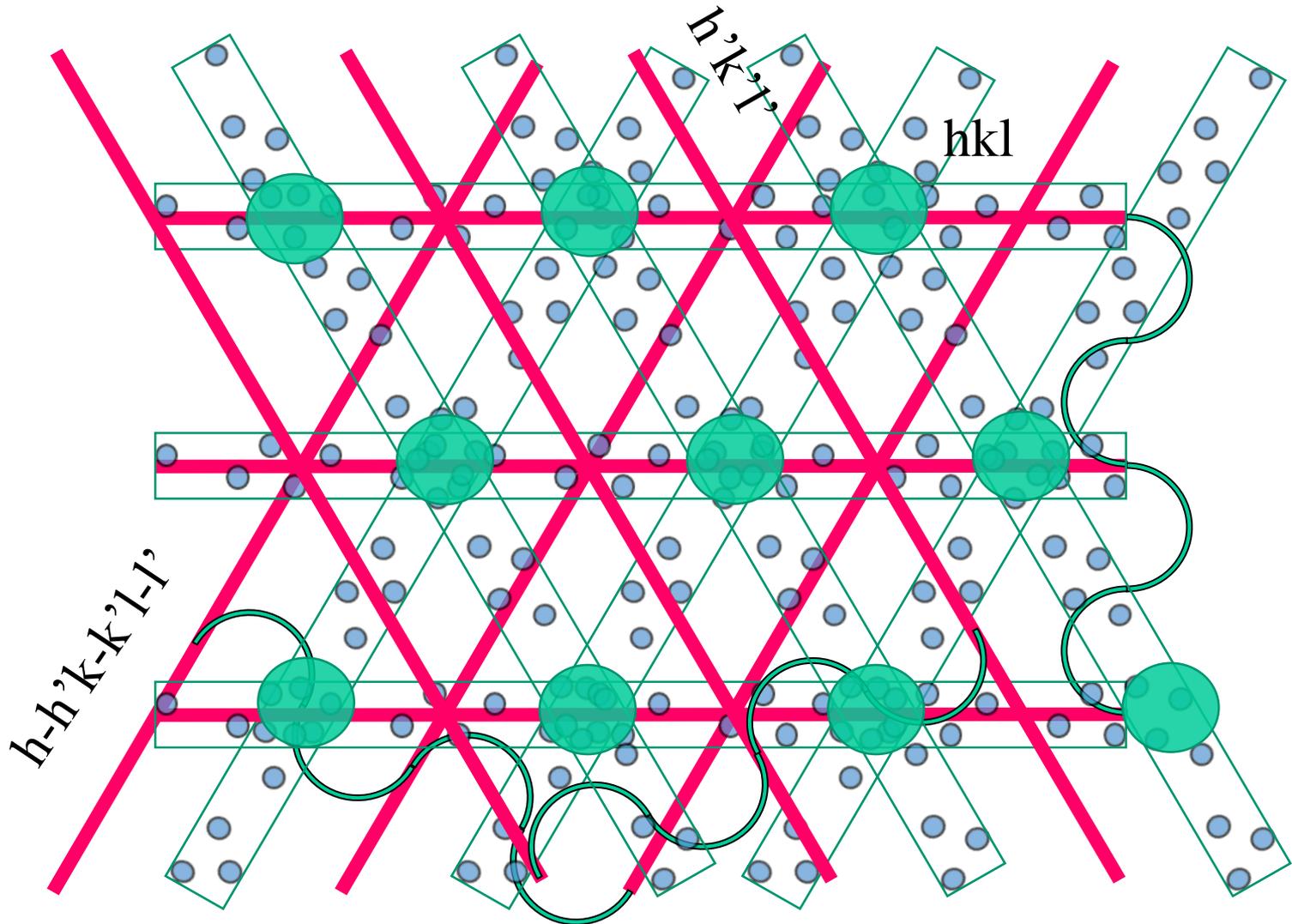
Relazione di tripletto

$$E_{hkl} = f; \varphi_{hkl} = 0 \quad E_{h'k'l'} = f; \varphi_{h'k'l'} = 0 \Rightarrow E_{h-h'k-k'l-l'} = f; \varphi_{h-h'k-k'l-l'} = 0$$



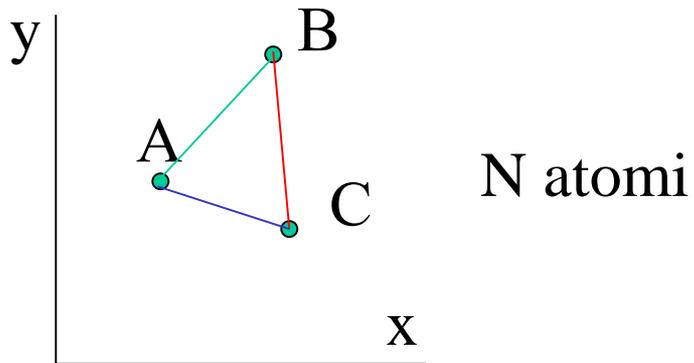
Relazione di tripletto

$$E_{hkl} = f; \varphi_{hkl} = 0 \quad E_{h'k'l'} = f; \varphi_{h'k'l'} = \pi \Rightarrow E_{h-h'k-k'l-l'} = f; \varphi_{h-h'k-k'l-l'} = \pi$$



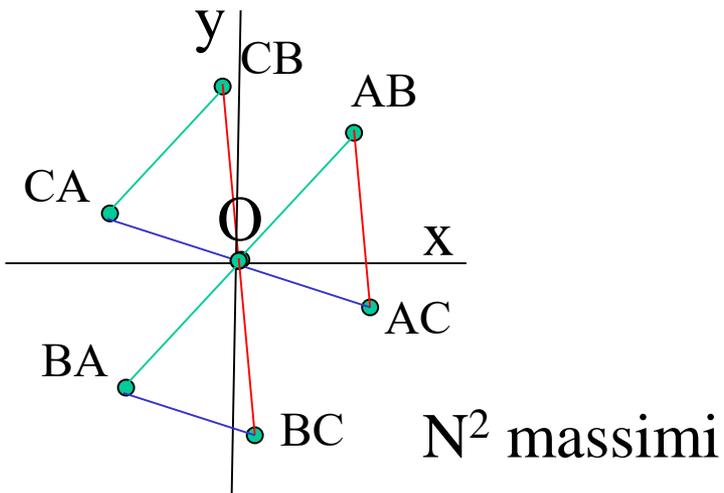
Risoluzione del problema della fase mediante sovrapposizione della funzione Patterson

“Struttura”



“Sovrapposizione Patterson”

“Patterson”



Programma SHELXT schema della procedura

- Sovrapposizione Patterson e ottenimento di un modello
- Cicli iterativi nello spazio duale usando il gruppo spaziale P1 (trasformata ed antitrasformata di Fourier)



modificando la densità elettronica (maschere per definire gli atomi, togliendo in modo casuale alcuni massimi di densità elettronica)

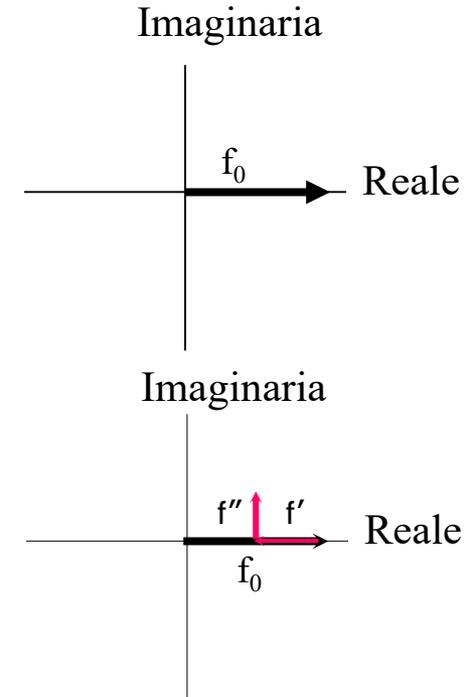
- Selezione della soluzione usando delle figure di merito
- Determinazione della posizione dell'origine utilizzando le fasi
- Determinazione del gruppo spaziale testando le possibili soluzioni
- Assegnazione degli elementi chimici alle densità elettroniche
- Affinamento isotropico

Diffusione Anomala

Per la dispersione distante dallo spigolo di assorbimento, il fattore atomico di scattering può essere rappresentato come un numero reale:

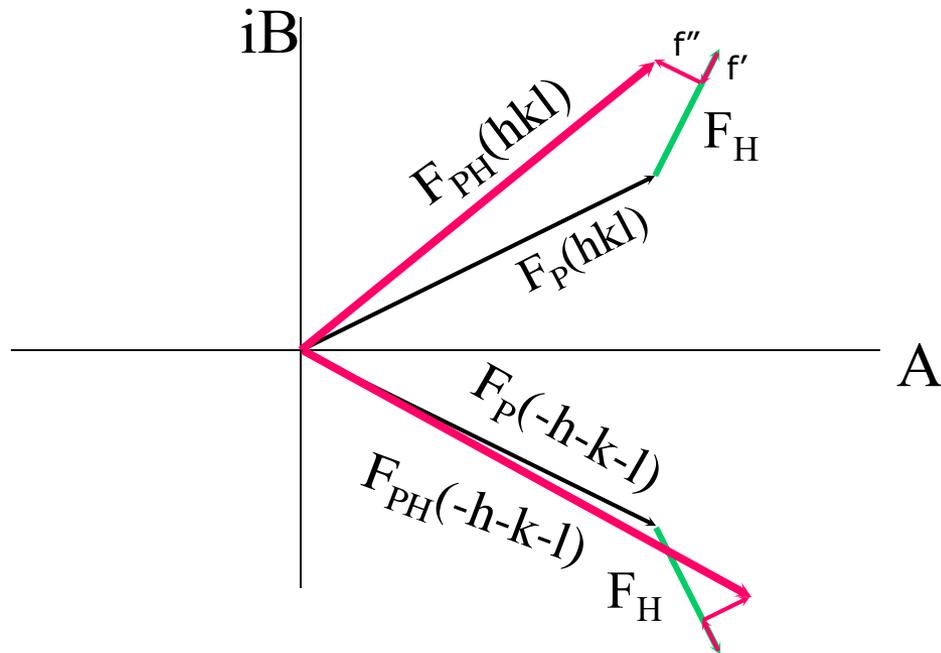
Se i raggi X hanno un'energia che è vicino ad una transizione elettronica dell'atomo, la parte reale della dispersione si modifica con f' e la fase con f''
 $f_j = f_0 + f' + if''$

$$F(h, k, l) = \sum_j f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$



- Se f_j è reale, vale sempre legge di Friedel $|F(hkl)| = |F(-h-k-l)|$ $|F(hkl)|^2 = I(hkl) = I(-h-k-l)$
- Se f_j ha una componente immaginaria, allora in generale $|F(hkl)| \neq |F(-h-k-l)|$

Dalle coppie di Friedel alle coppie di Bijvoet



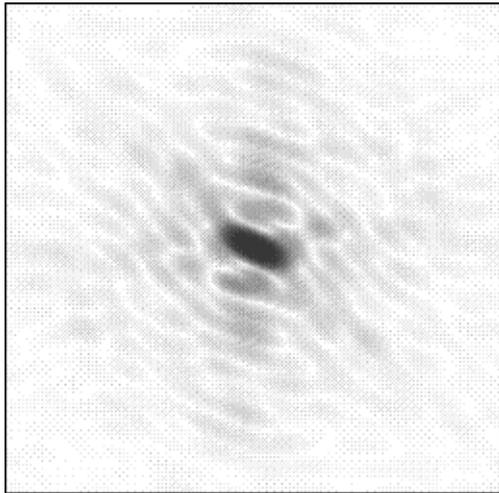
Il presenza di diffusione anomala il modello con coordinate xyz si distingue dal modello $-x-y-x$.

Si riesce a determinare la configurazione assoluta delle molecole

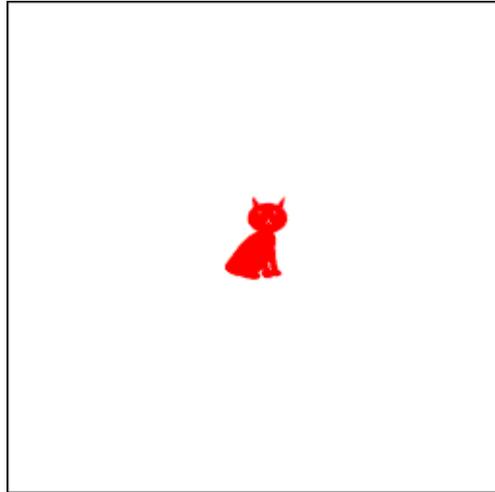
Mappe di densità elettronica $|F_o|$



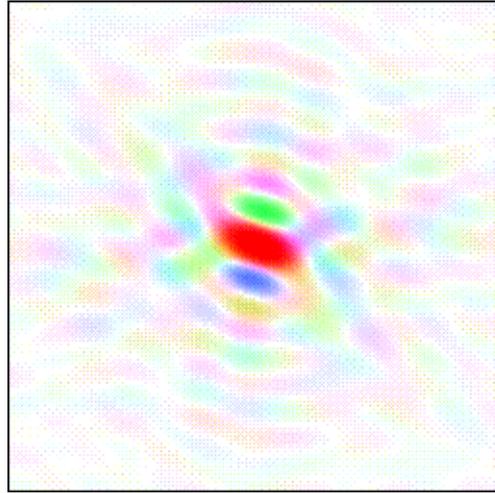
Diffrazione



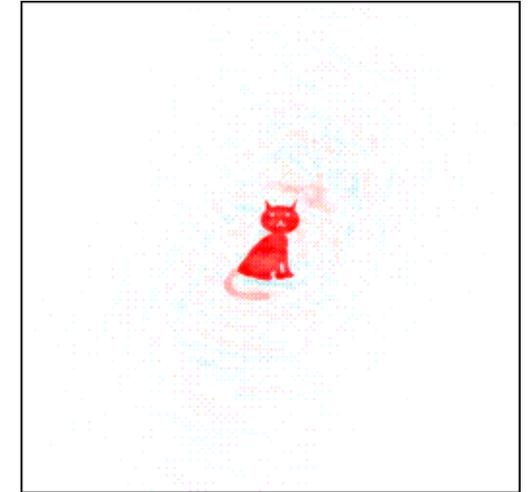
$$|F|(\text{gatto}) = |F_o|$$



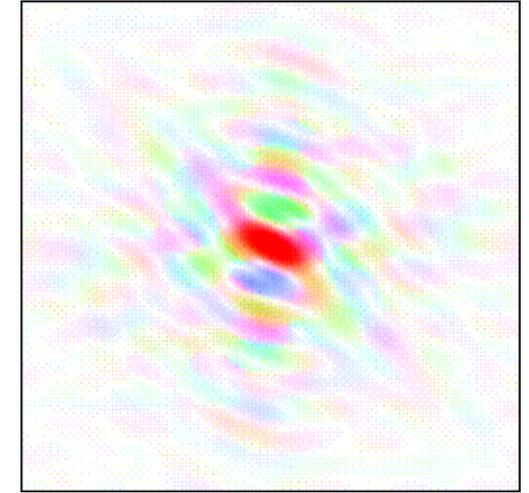
Trasformata
di Fourier



$$F(\text{gatto-coda}) = |F_c| \phi_c$$

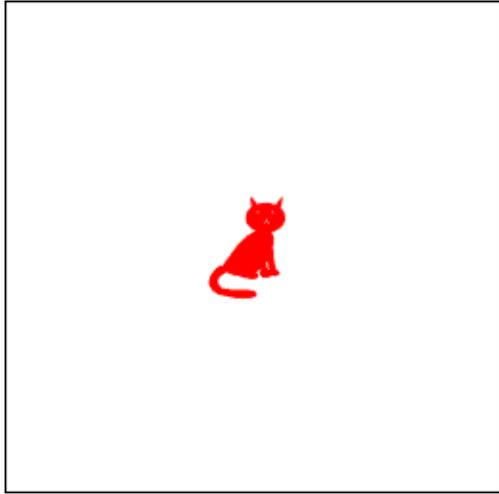


Sintesi
di Fourier

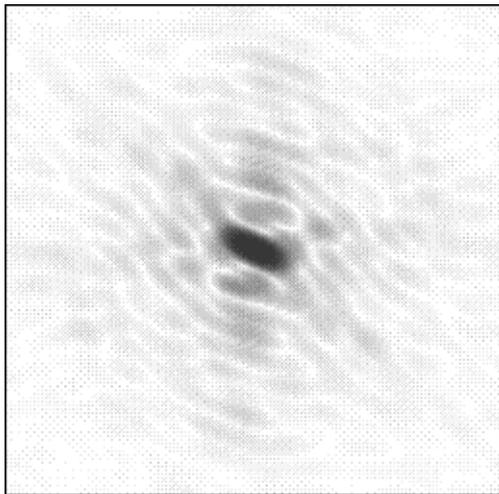


$$|F_o| \phi_c$$

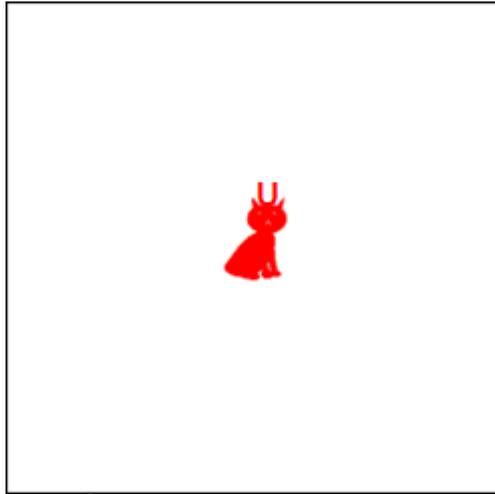
Fourier Differenza $|F_o| - |F_c|$



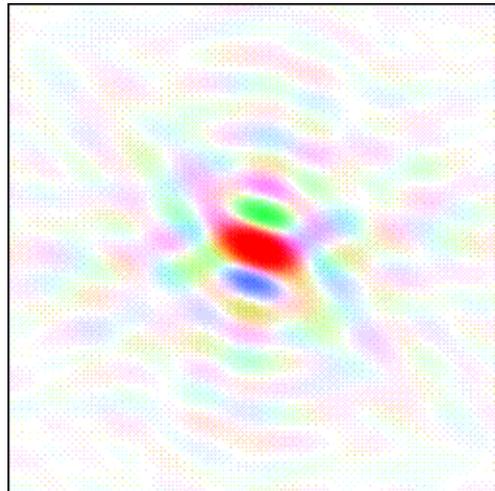
Diffrazione



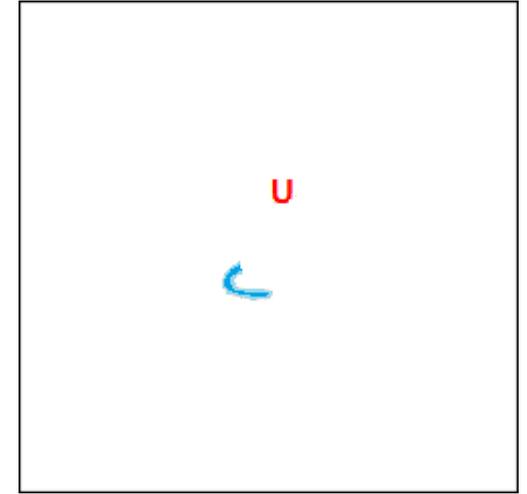
$$|F|(\text{gatto}) = |F_o|$$



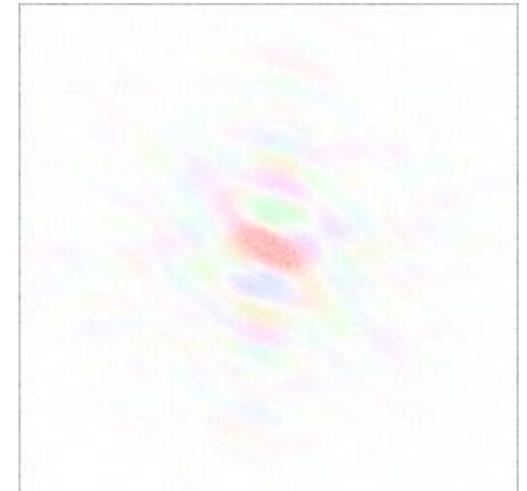
Trasformata
di Fourier



$$F(-\text{coda} + \text{corna}) = |F_c| \phi_c$$

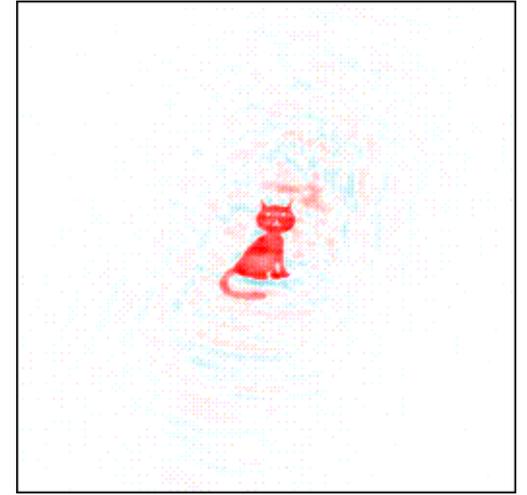
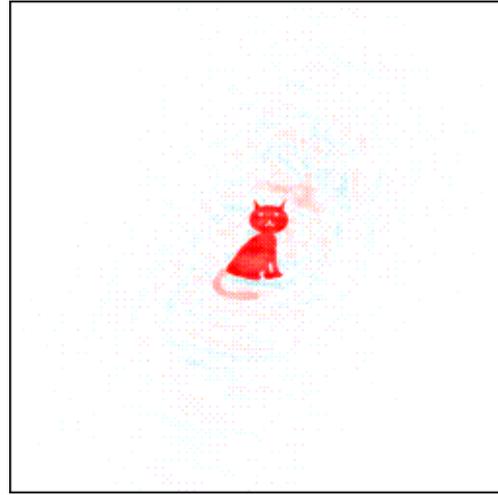
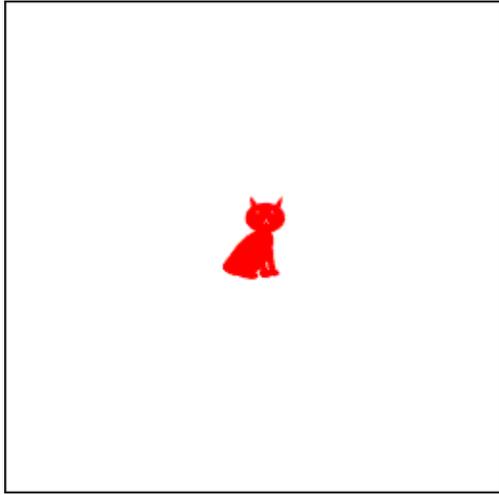


Sintesi
di Fourier



$$|F_o| - |F_c| \quad \phi_c$$

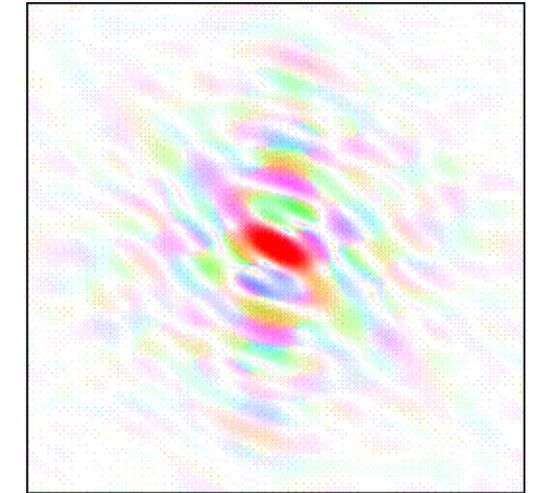
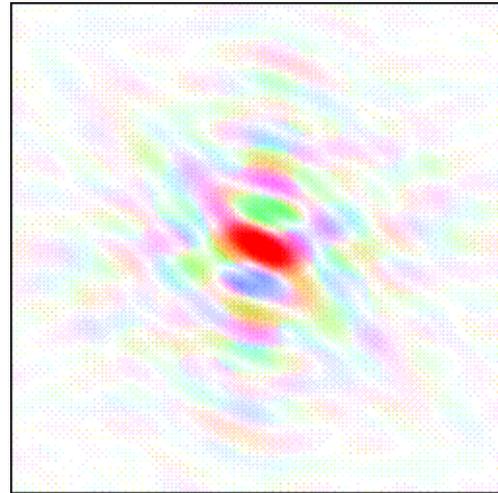
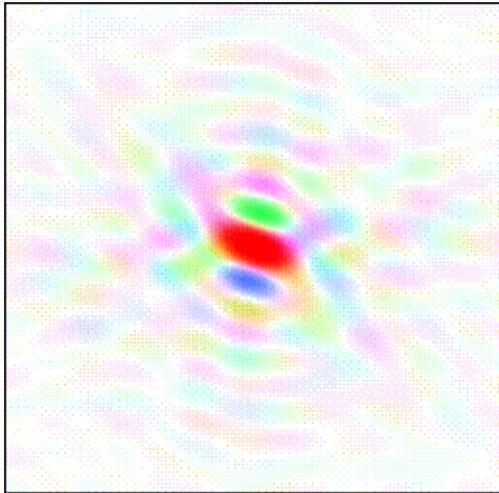
Mappe 2Fo-Fc



Trasformata
di Fourier

Sintesi di
Fourier

Sintesi di
Fourier

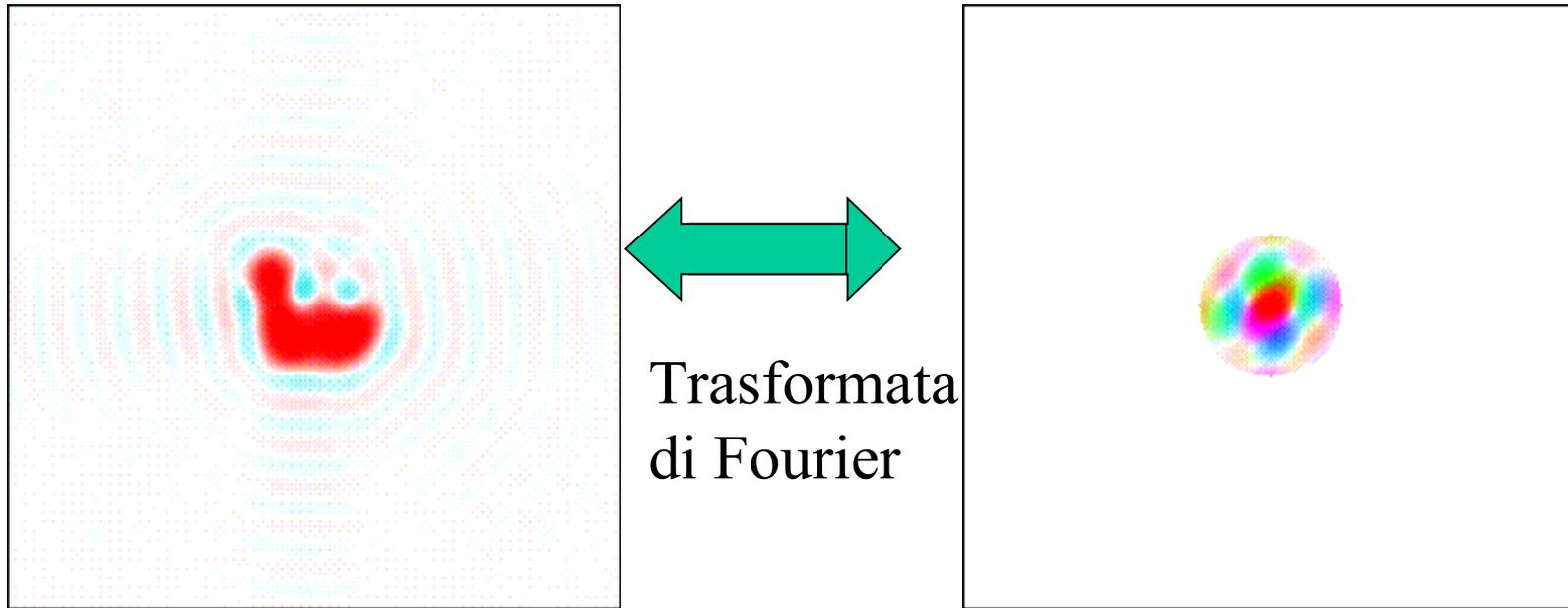


$$F(\text{gatto-coda}) = |F_c| \phi_c$$

$$|F_o| \phi_c$$

$$2|F_o| - |F_c| \phi_c$$

Limite di risoluzione

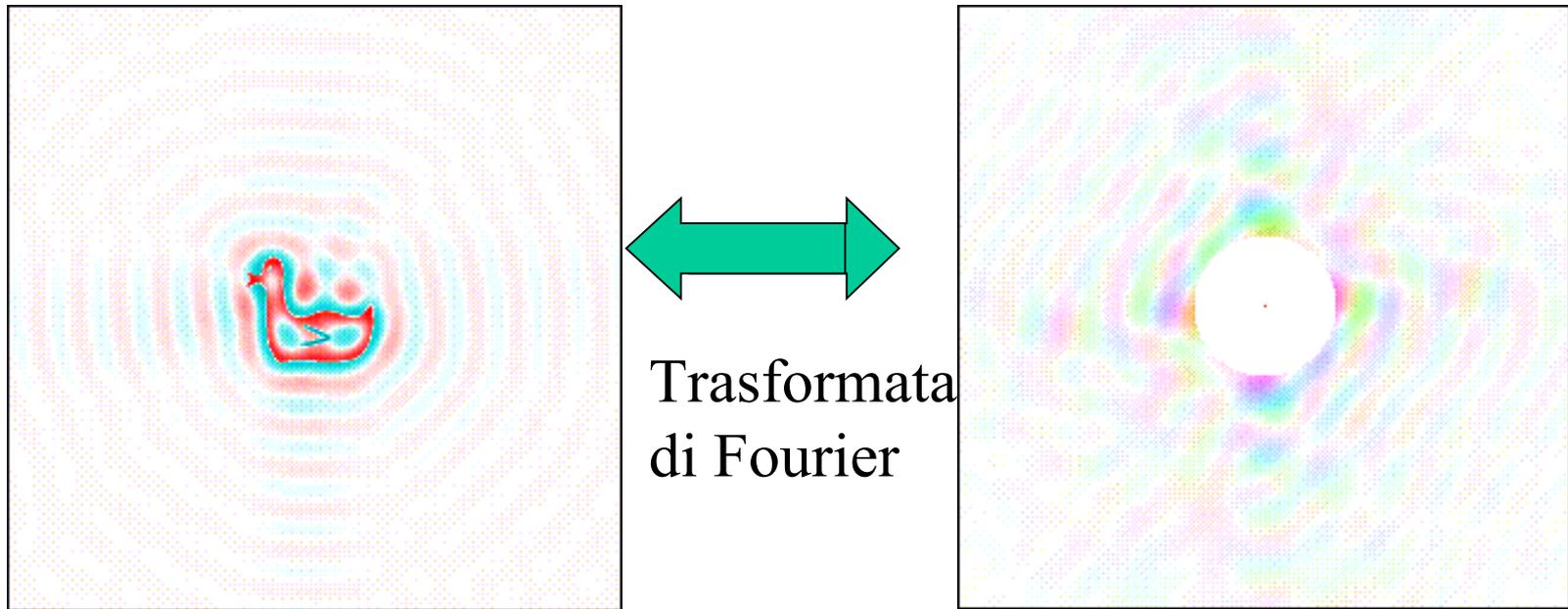


$$\text{RISOLUZIONE} = d_{\text{min}} = \lambda / 2 \sin \theta_{\text{max}}$$

2.0-3.0 Å Tipica risoluzione delle strutture di proteine con densità elettronica convoluta. Le catene laterali degli a.a. possono essere identificate con il 50% di probabilità senza altre informazioni. Le acque più fortemente legate alla proteina possono essere localizzate e la struttura è affinata con moti termici isotropici utilizzando vincoli geometrici per gli atomi.

1.2-0.7 Å Mappe di densità con atomi risolti, risoluzione a livello atomico. Possibilità di intravedere e localizzare anche gli idrogeni. Affinamento degli atomi in modo indipendente con moto termico B di tipo anisotropo.

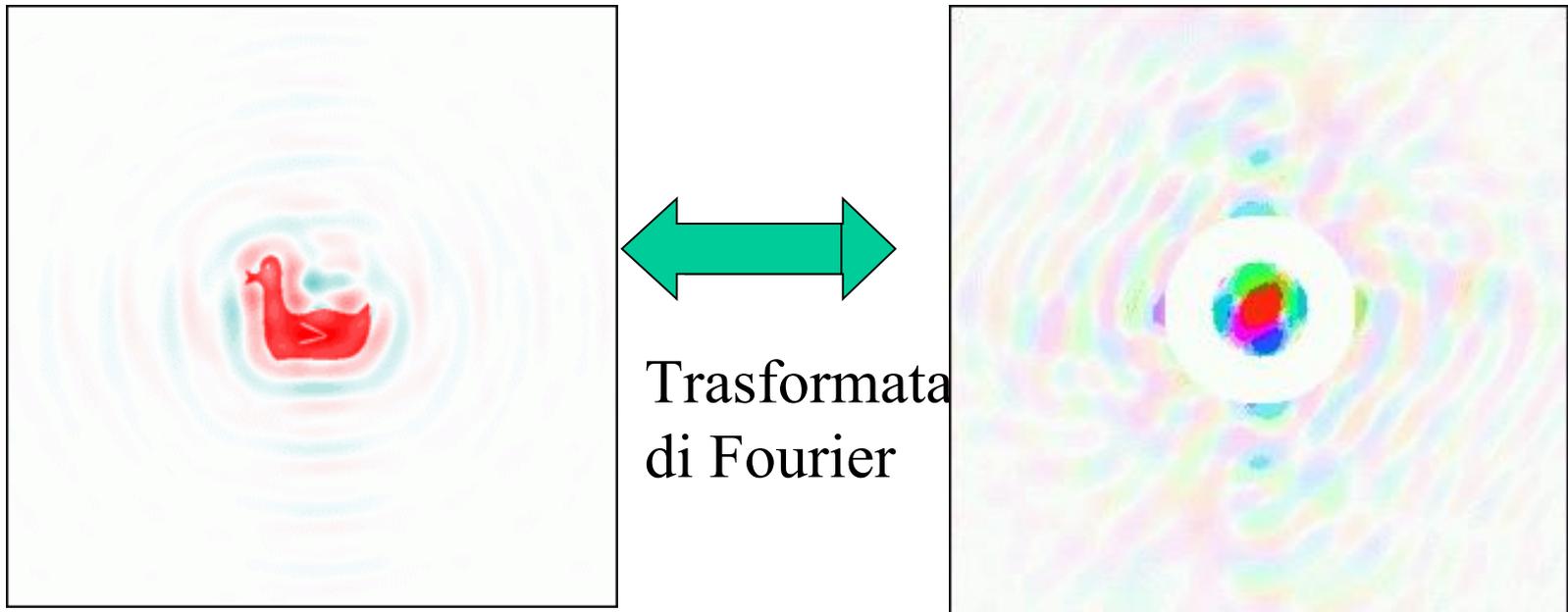
Effetti sulle mappe di dati incompleti



Mancanza di dati a bassa risoluzione (ad esempio a causa del beamstopper o di saturazione del detector)

La mappa è disturbata e può essere difficile localizzare la parte più mobile della struttura/solvente

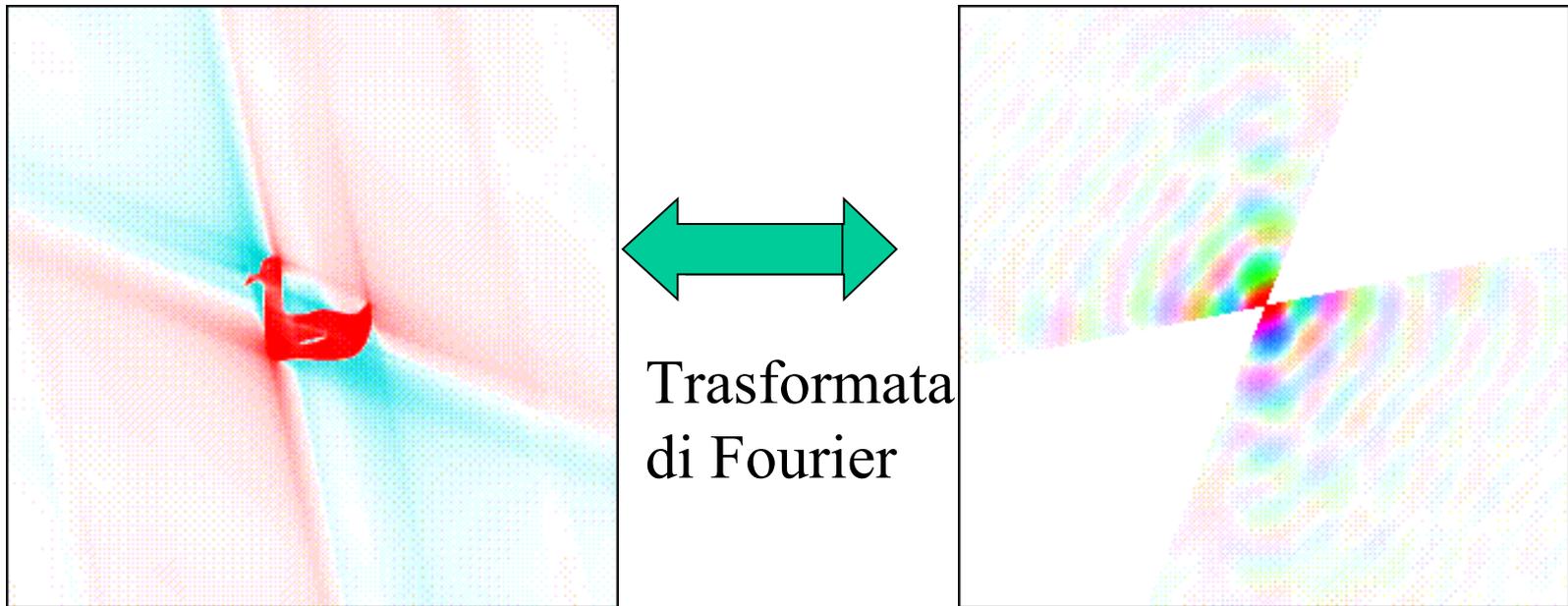
Effetti sulle mappe di dati incompleti



Mancanza di uno shell intero di dati (ad esempio a causa di anelli di diffrazione di ghiaccio)

I bordi sono abbastanza nitidi (buona risoluzione), ma sono sporcati dalla mancanza dei dati a risoluzione intermedia

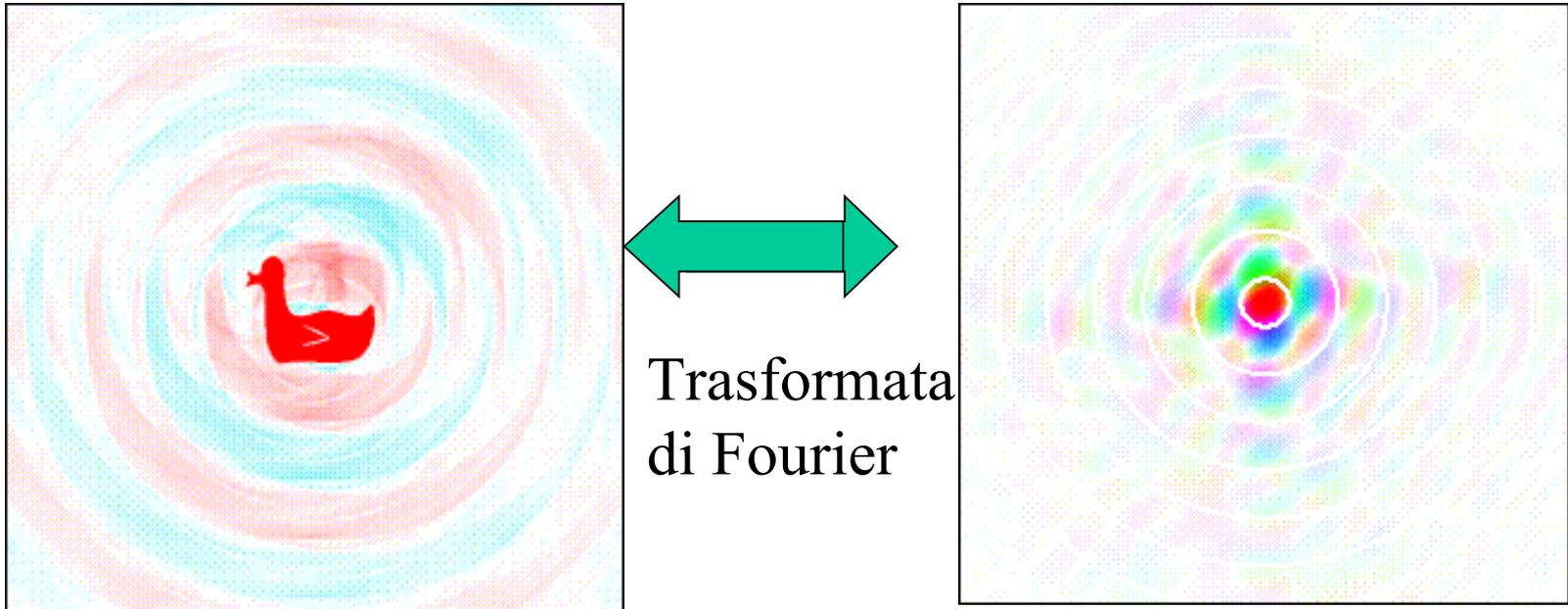
Effetti sulle mappe di dati incompleti



Mancanza di zone intere di dati (ad esempio a causa di una bassa simmetria e di perdita dei riflessi azimutali)

La densità elettronica perpendicolare ai dati mancanti è più debole e ci possono essere dei problemi con l'affinamento anisotropico degli atomi

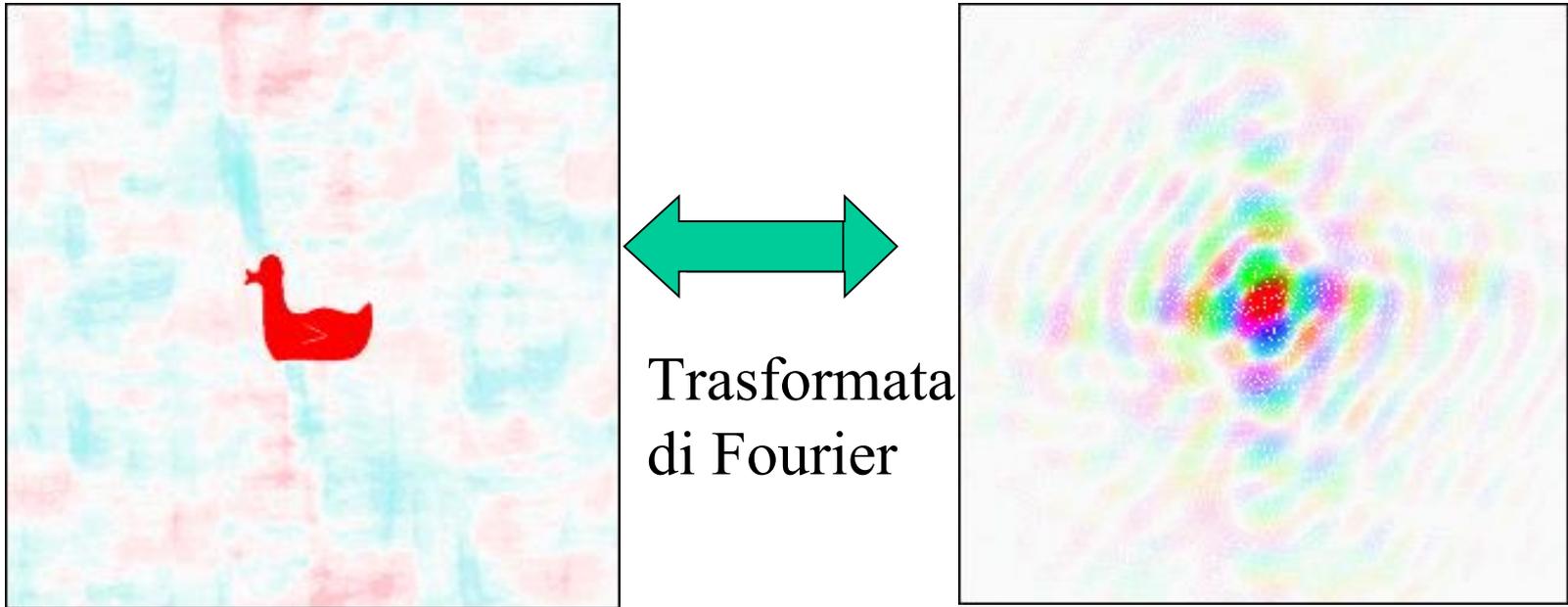
Effetti sulle mappe di dati incompleti



Mancanza del 10% di dati in shell strette (ad esempio a causa di una sovrapposizione con uno spettro di polvere)

Presenza nella densità elettronica di disturbi importanti

Effetti sulle mappe di dati incompleti



Mancanza del 10% di dati in modo casuale

Piccoli disturbi nella densità elettronica

AFFINAMENTO

MODELLO DI PARTENZA

**ALCUNI CICLI DI AFFINAMENTO PER
RENDERE MINIMI GLI SCARTI TRA
 $|F_o|^2$ E $|F_c|^2$ O TRA $|F_o|$ E $|F_c|$.
Modificando xyz e B degli atomi**

CALCOLO DEI FATTORI DI STRUTTURA

(Fasi)

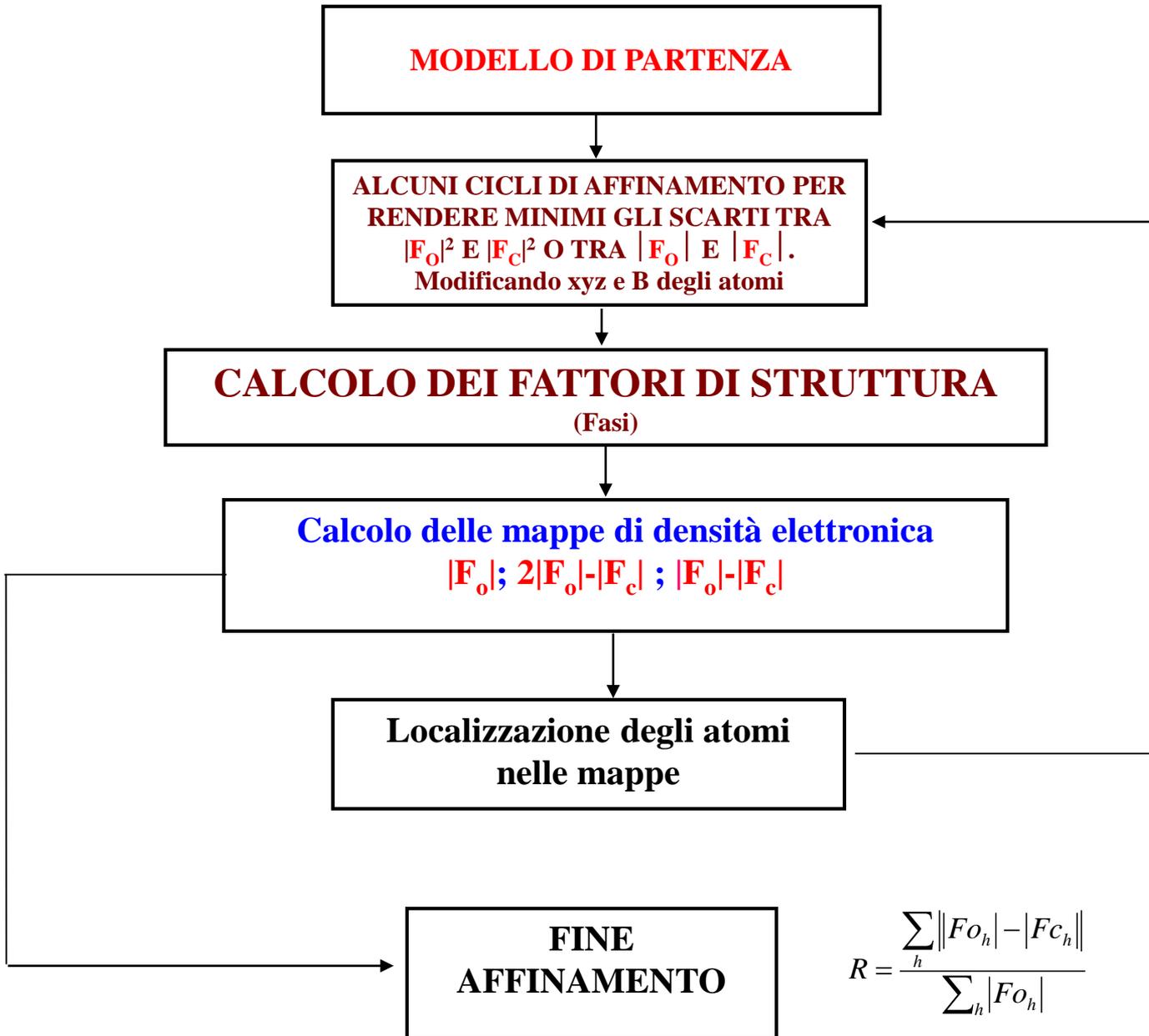
Calcolo delle mappe di densità elettronica

$|F_o|$; $2|F_o| - |F_c|$; $|F_o| - |F_c|$

**Localizzazione degli atomi
nelle mappe**

**FINE
AFFINAMENTO**

$$R = \frac{\sum_h ||F_{O_h}| - |F_{C_h}||}{\sum_h |F_{O_h}|}$$



Dall'intensità ai moduli dei fattori di struttura

$$I_{hkl} = k |F_{hkl}|^2 L(\theta) p(\theta) A(\theta) d(t)$$

- $L(\theta)$ è il fattore di **Lorentz** che tiene conto della velocità angolare di scansione con la quale il punto del reticolo reciproco passa attraverso la sfera di Ewald (dipende dalla geometria di diffrazione)
- $p(\theta)$ è il fattore di **polarizzazione** della radiazione dovuta alla diffrazione del cristallo ed eventualmente dalla sorgente (Sincrotrone) e/o dal cristallo monocromatore.
- $A(\theta)$ è il fattore di attenuazione dei raggi primario e diffratto dovuto all'assorbimento (tipo Lambert-Beer $I = I_0 \exp^{-\mu x}$) integrato su tutto il *volume* del cristallo per tutti i differenti cammini ottici. Dipende dalla **forma** e dalle **dimensioni** del cristallo e dalla sua **composizione** chimica. Per cristalli *sferici* la correzione dipende solo da θ .
- $d(t)$ decadimento della intensità di diffrazione nel tempo (danno da raggi-X o non costanza della dose di raggi-X sul cristallo)

Trattamento del moto termico

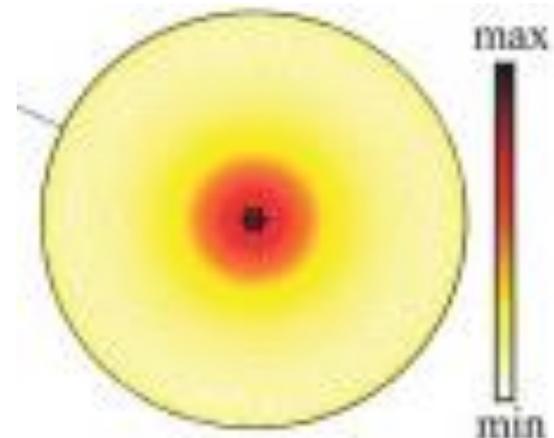
Fino ad ora abbiamo considerato gli atomi come centri diffusori "statici" ossia fissi in alcune posizioni nella cella unitaria.

In realtà, essi sono soggetti a oscillazioni attorno alle posizioni di equilibrio. Tali oscillazioni sono funzione della temperatura e avvengono anche a $T = 0$ K.

Il parametro che descrive l'oscillazione di un dato atomo in funzione dello spostamento quadratico medio dalla posizione di equilibrio

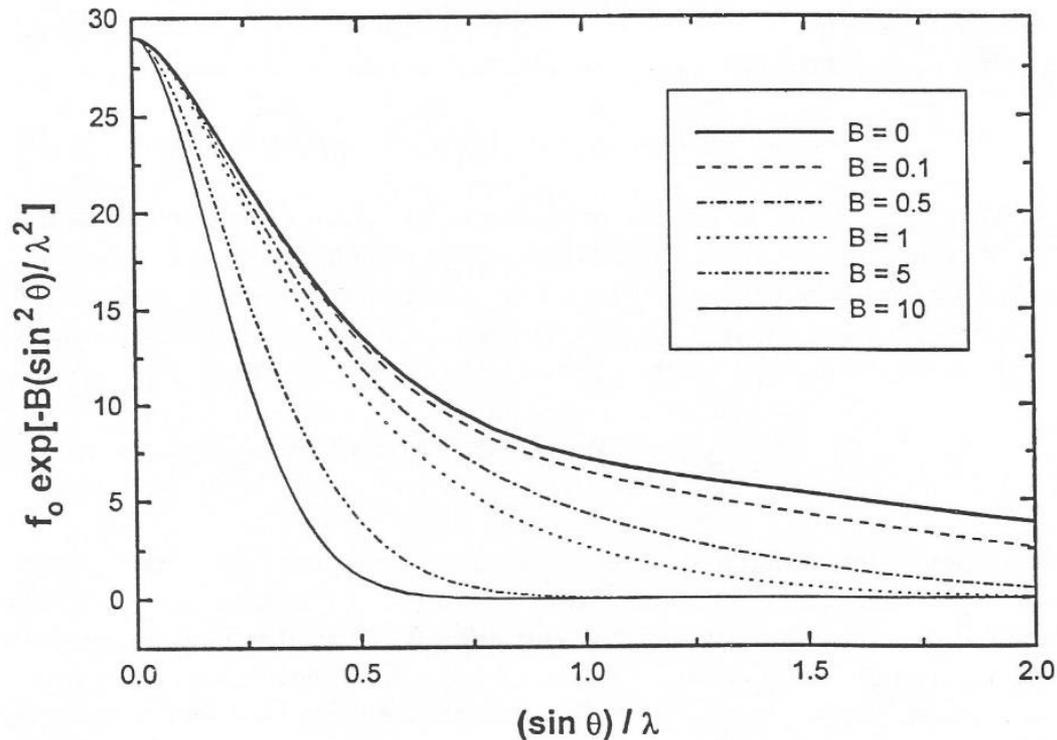
$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle = 8\pi^2 U$$

$\langle u^2 \rangle$ è lo spostamento quadratico medio per un moto armonico **isotropo** intorno alla posizione di equilibrio (in \AA^2)



Il moto termico, distribuendo la densità elettronica attenua la diffusione da parte di un atomo in funzione dell'angolo di diffrazione secondo il fattore di Debye-Waller .

$$f_j = f_j^0 \exp -B(\sin^2\theta/\lambda^2)$$



A Temperatura ambiente tipicamente

i cristalli ionici hanno $0.5 < B_{\text{iso}} < 2.0$

i cristalli molecolari hanno $3.0 < B_{\text{iso}} < 6.0$

A 100 K i valori di B si abbassano più della metà

$B_{\text{iso}} = 4$ significa $\sqrt{\langle u^2 \rangle}$ di 0.22 \AA (15% di $d_{(\text{C-C})} 1.5 \text{ \AA}$)

$B_{\text{iso}} = 1.5$ significa $\sqrt{\langle u^2 \rangle}$ di 0.14 \AA (9% di $d_{(\text{C-C})} 1.5 \text{ \AA}$)

Ad alto θ ($>30^\circ$ con tipica radiazione Mo- K_α), cristalli ionici mostrano intensità diffratta e cristalli molecolari no!

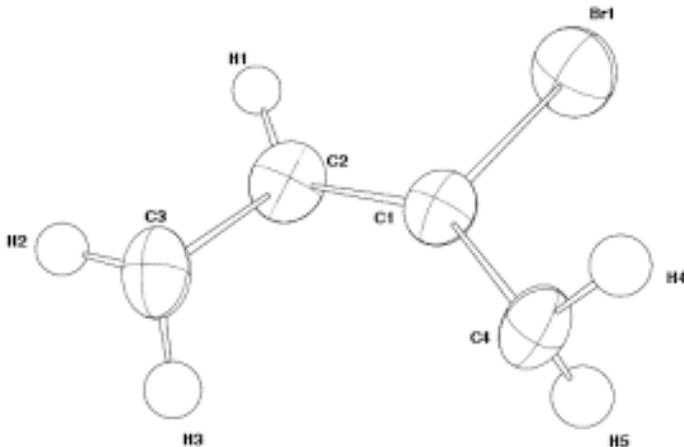
L'abbassamento della temperatura aumenta l'angolo massimo di diffrazione (migliore risoluzione)

migliora l'accuratezza della posizione degli atomi

Lo spostamento quadratico medio può essere di tipo isotropo oppure anisotropo (ossia differente a seconda delle direzioni, e quindi la regione di spazio sarà un ellissoide descritto da 6 parametri U_{11} , U_{22} , U_{33} , U_{12} , U_{13} , U_{23}).

Fattore termico anisotropo

$$\exp -2\pi^2(h^2a^*2U_{11}+k^2b^*2U_{22}+l^2c^*2U_{33}+hka^*b^*U_{12}+hla^*c^*U_{13}+klb^*c^*U_{23})$$



Rappresentazione con ellissoidi che racchiudono il 50% di probabilità

Metodo dei Minimi Quadrati (Legendre, 1806)

Tecnica numerica per trovare il miglior accordo tra un **particolare modello sperimentale** e un **set di dati sperimentali**.

Si assume che i parametri **migliori** che descrivono il modello sono quelli che **minimizzano** la somma dei quadrati degli scarti **tra quantità osservate e calcolate** (minimizza R).

I **minimi quadrati pesati** associano ad ogni osservabile un peso statistico (tipicamente inversamente proporzionale alla sua precisione).

Dato un gruppo di parametri $\mathbf{P} = \{p_1, ..p_m\}$, i valori $|F_c(\mathbf{P})|$ vengono confrontati con $|F_o|$ e minimizzata, al variare di \mathbf{P} , la quantità:

$$\mathbf{Q} = \sum_{hkl} w(\mathbf{hkl}) [|F_o(\mathbf{hkl})| - |F_c(\mathbf{hkl})|]^2$$

dove $w(\mathbf{hkl}) = 1/\sigma^2(|F_o(\mathbf{hkl})|)$ (affinamento sugli F)

oppure: $\mathbf{Q} = \sum_{hkl} w(\mathbf{hkl}) [|F_o^2(\mathbf{hkl})| - |F_c^2(\mathbf{hkl})|]^2$ (affinamento sugli F²)

In pratica **P** include per ogni atomo non-H, x, y, z, B (modello **isotropo**, 4 parametri) o $x, y, z, b_{11}, b_{22}, b_{33}, b_{23}, b_{13}, b_{12}$ (**anisotropo**, 9 parametri) ed eventualmente un parametro di occupazione (caso di disordine). Inoltre, c'è sempre il fattore di scala più l'eventuale correzione per l'estinzione secondaria (importante per i riflessi intensi a basso angolo).

In generale, **i parametri da affinare** per N atomi non-H sono **$(9N+1)$**

Ad esempio per una struttura semplice come il saccarosio ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 23 atomi non-H il numero di parametri è $23 \times 9 + 1 = 208$

Per una sufficiente accuratezza senza problemi di sovra-affinamento, servono **dai 7 ai 12 dati sperimentali per parametro** quindi attorno ai 2000 riflessi osservati indipendenti per un affinamento di un modello anisotropico del saccarosio.

Se si raccolgono circa 1000 riflessi l'affinamento può essere fatto modellando il moto termico degli atomi solo in modo isotropico.

Dal punto di vista matematico: bisogna trovare il minimo assoluto di una funzione Q non lineare di 208 variabili reali mettendo a zero la derivata di Q per ogni parametro p_i

Naturalmente questo processo **non** può essere risolto analiticamente senza un modello di partenza.

E' comunque possibile affrontarlo se sono noti i valori approssimati p_0 calcolando i valori delle derivate dall'espansione di Taylor al prim'ordine.

In questo caso la soluzione sarà ottenibile attraverso diversi cicli di minimi quadrati, fino a convergenza

Si possono incontrare delle problematiche di convergenza a causa della correlazione tra i parametri da affinare (ad esempio moto termico e parametro di occupazione e/o densità elettroniche sovrapposte nel caso di disordine strutturale)

Constraints e Restraints

Per favorire il processo di convergenza dei minimi quadrati o per imporre particolari condizioni geometriche, è possibile *condizionare* il processo di affinamento limitando il numero o il campo di variabilità di alcuni parametri.

Constraint: relazione matematica **esatta** che fissa un parametro o mette in relazione parametri diversi. Esempi:

- Atomi posti su elementi di simmetria cristallografica: ad esempio su un asse binario lungo l'asse b si fissa la coordinata $y = 0$; per un atomo su un piano diagonale xxz, x e y vengono posti uguali. Anche i moti termici anisotropici assumono i constraint della simmetria cristallina.
- Per un fenile, ad esempio si può imporre che la simmetria sia esattamente D_{6h} , dei $6 \times 3(xyz) = 18$ parametri, solo 7 rimangono *indipendenti* (xyz, R_x, R_y, R_z e dc-c) oppure utilizzando modelli a corpo rigido affinando solo posizione del centro di massa e relativa rotazione.
- Per atomi *vicarianti*, ad esempio Fe^{II} e Mg^{II} posti sullo stesso sito si possono vincolare i parametri di occupazione $occ(Fe) = [1.0 - occ(Mg)]$

Restraint: Osservazione sperimentale aggiuntiva che può derivare dall'analisi di banche dati, modelli esterni, spettroscopia (NOE, I.r.) che limita il campo di esistenza per alcuni parametri ($\mathbf{p}_i \pm \mathbf{Dp}_i$) o di una loro funzione $d(\mathbf{p}_{i,n}) \pm \Delta d(\mathbf{p}_{i,n})$.

Matematicamente fa **aumenta** il numero delle equazioni (una per ogni osservazione) e queste osservazioni necessitano di essere 'pesate'

$$Q_{\text{TOT}} = \sum_{hkl} w(hkl) [|F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|]^2 + \mathbf{W} \sum_p w_p [d_o - d_c]^2$$

Q_{TOT} , funzione costo complessiva da minimizzare e può contenere termini geometrici, energetici, spettroscopici, etc.

Esempi:

- Distanze tra atomi; angoli di legame.
- Parametri termici isotropi (variazione all'interno di una certa σ)
- Parametri termici anisotropici (restringendo l'anisotropia)

Procedura di affinamento e Valutazione del modello strutturale

Durante il processo di costruzione del modello e di affinamento:

- Il fattore di disaccordo R_w deve scendere (minimizzazione di Q).
- Gli atomi devono rimanere in prossimità del punto di partenza.
- I fattori B devono essere omogenei e consistenti con la connettività.
- I fattori b_{ij} non devono essere esageratamente anisotropi o dare ellipsoidi negativi.
- La mappa di Fourier Differenza deve *appiattirsi* (interpretazione dei massimi e dei minimi).
- Si verifica e si aggiorna lo schema di pesaggio
- Si deve far convergere l'affinamento rimuovendo eventuali problemi di correlazione tra i parametri.
- Si controllano le riflessioni outlier ($|F_o(hkl)| - k|F_c(hkl)| / \sigma|F_o(hkl)|$ maggiore di 6 ad esempio) ed eventualmente si omettono

Alla fine del processo di affinamento:

1. Il fattore R deve essere accettabile (dipende dalla complessità della struttura e dal disordine presente) e il gof prossimo ad 1.000.
2. La mappa di Fourier Differenza Finale deve mostrare massimi e minimi $\Delta\rho$ inferiori a $\sigma(\Delta\rho)$.
3. Qualsiasi anomalia geometrica nella molecola o nelle interazioni di impaccamento deve essere valutata, commentata e giustificata.
4. Il programma checkcif controlla in modo sistematico le anomalie presenti nell'affinamento del modello mostrando degli Alerts ordinati secondo il grado di importanza.

Le **esd** di ogni parametro che si ottiene dalla procedura di affinamento hanno senso statistico solo per errori **casuali**, si presume quindi l'**assenza** di errori **sistematici** (molto comuni).

Spesso rappresentano solamente la precisione, non l'accuratezza.

Se la distribuzione degli errori casuali è normale, allora la teoria dei minimi quadrati stima che:

Due valori che differiscono per meno di 2 esd, sono uguali al 95% di probabilità;

Due valori che differiscono per meno di 2.7 esd, sono uguali al 99% di probabilità;

Comunemente, si confrontano 2 valori con la regola:

Se differiscono di meno di 3 esd, non sono statisticamente differenti.

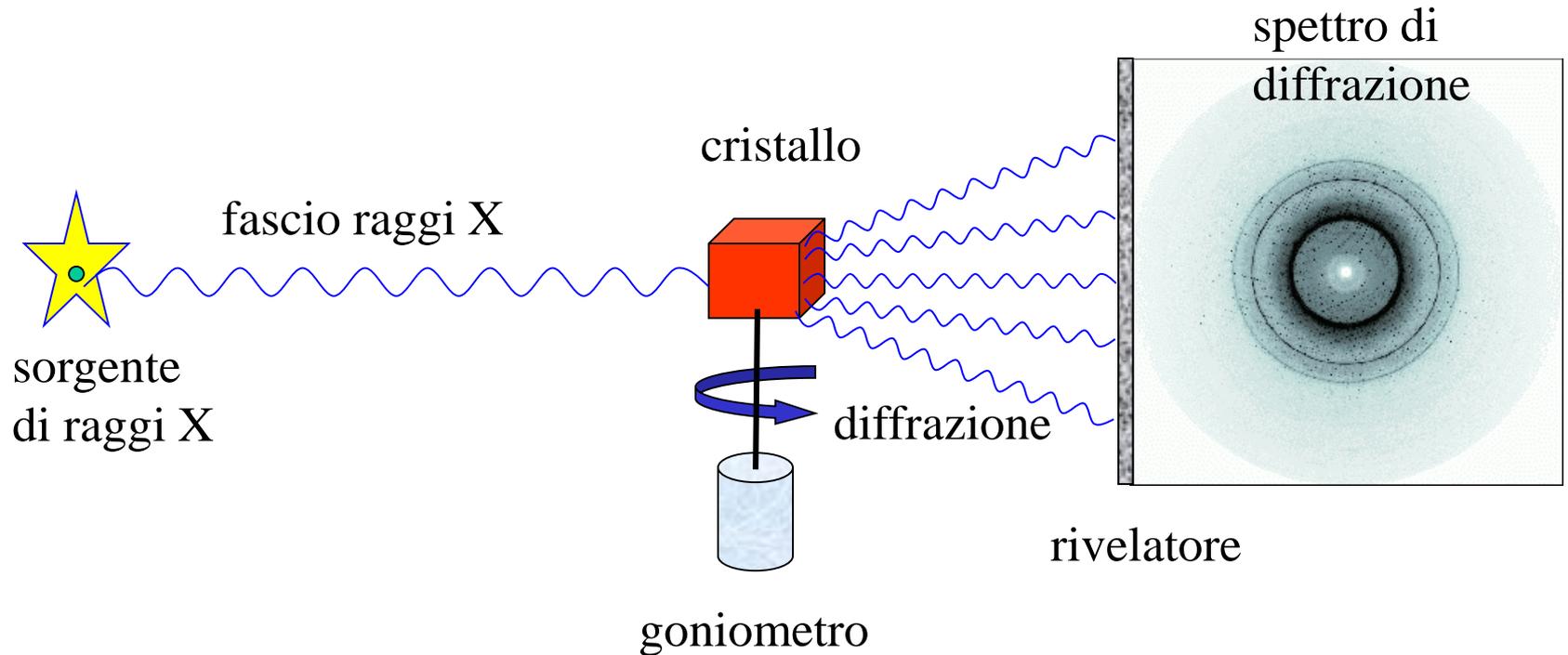
Ad esempio 1.560(7) non è significativamente diverso da 1.542(3)

Mentre 1.560(3) è significativamente diverso da 1.542(2)

Errori sistematici comuni:

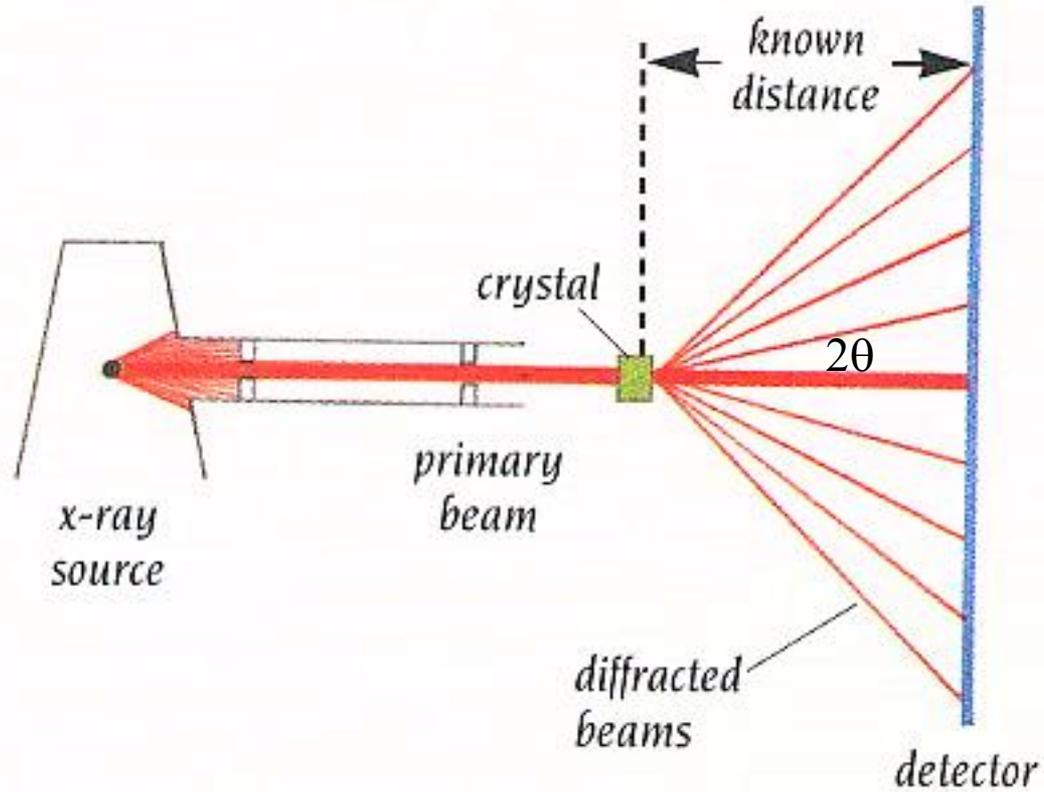
- Le curve dei *fattori di scattering* si assumono generalmente sferiche. Gli atomi **legati covalentemente** non sono **sferici** e la loro deformazione di densità elettronica verso i legami **non sempre è trascurabile**
- Il moto degli atomi in un cristallo può essere correlato (p.es. vibrazioni collettive di reticolo) o anarmonico (non bastano gli elissoidi).

Registrazione dello spettro di diffrazione

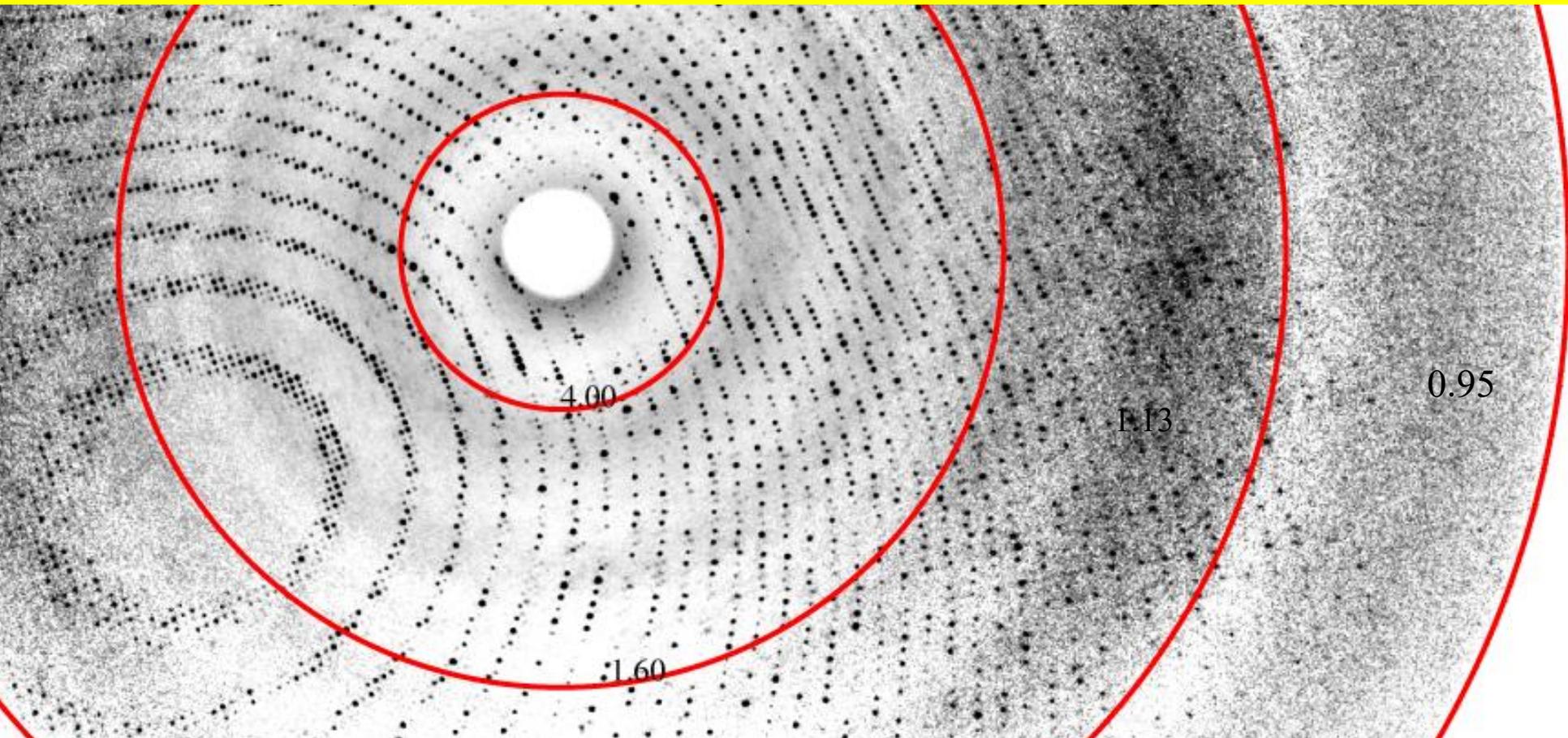


La direzione dei raggi-X diffratti è relazionata attraverso la legge di Bragg ai parametri della cella elementare del cristallo le intensità sono caratteristiche del tipo di atomi e della posizione relativa di essi nella cella elementare.

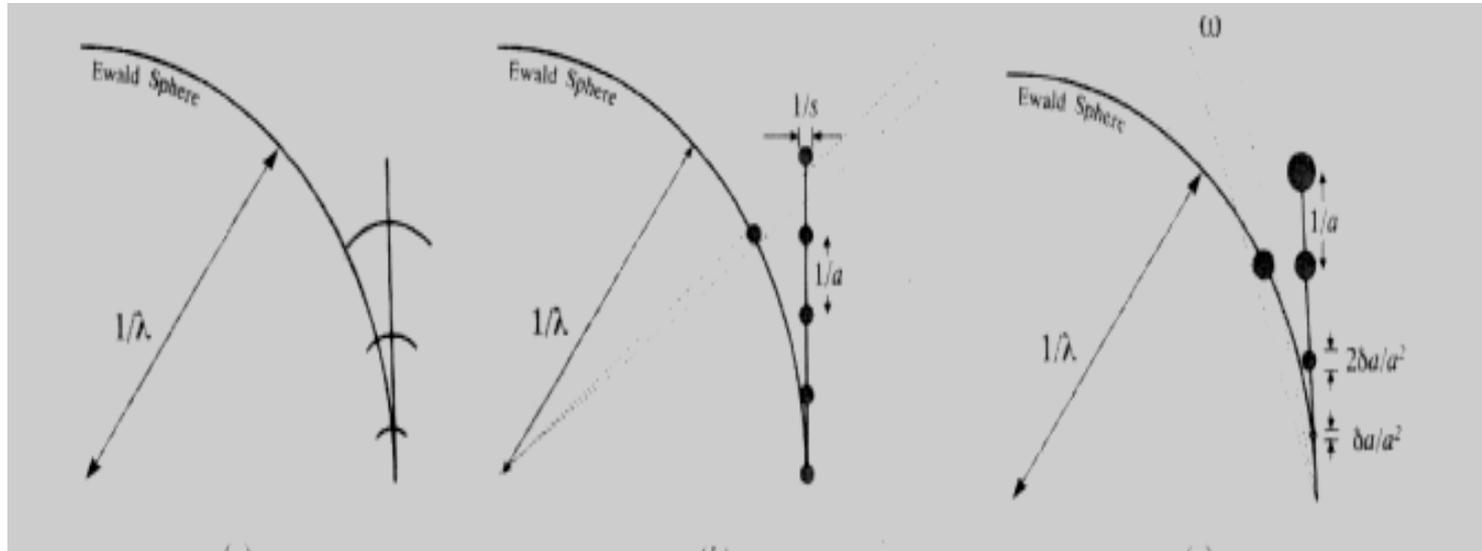
Raccolta Dati



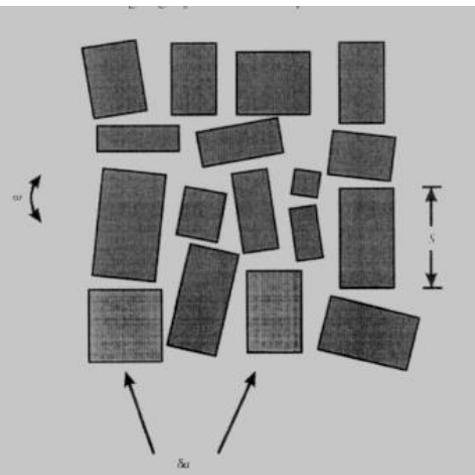
Indicizzazione = assegnare l'indice HKL a tutte le riflessioni
= determinare il reticolo reale (cella elementare) mediante il
reticolo reciproco



Mosaicità



In linea di principio i punti di un reticolo reciproco ottenuti da un cristallo di dimensioni infinite sono dei punti matematici, in pratica questo non è vero sia perché il cristallo è finito sia perché .



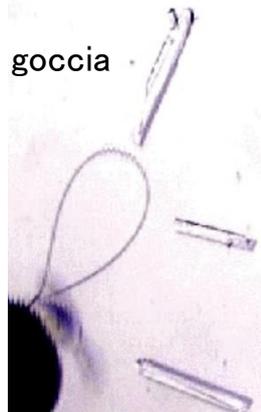
- Il monocristallo può essere visto come composto di molti domini parzialmente disallineati.
- I vari domini (che diffrangono per gli stessi angoli di Bragg) vengono messi in diffrazione in tempi ed angoli di rotazione del cristallo diversi.
- L'intensità del singolo riflesso è generalmente distribuita secondo una gaussiana.

Danno da Radiazione

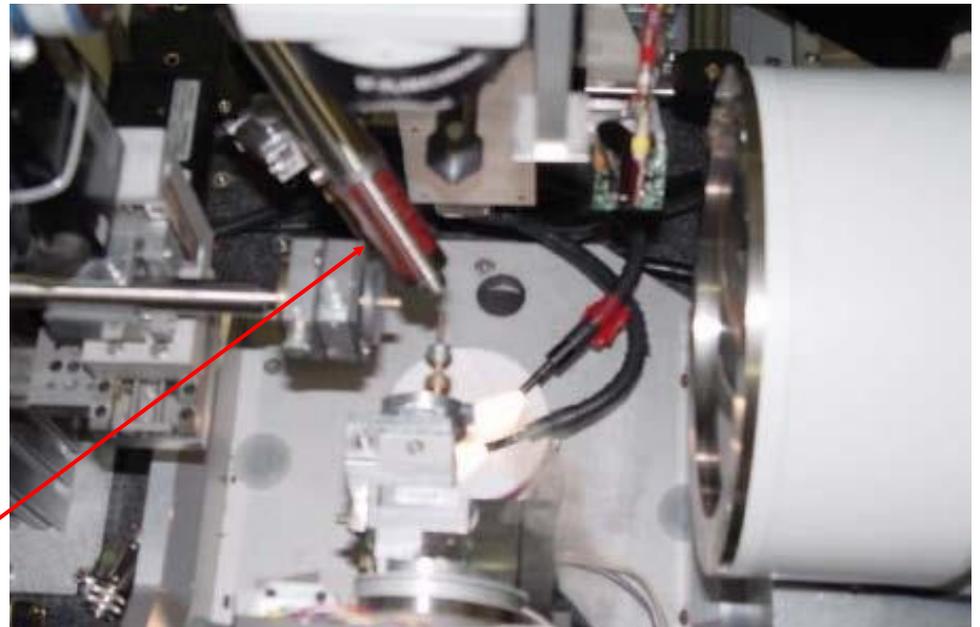
- I cristallo della proteina vengono danneggiati dall'esposizione al fascio di raggi X.
- I danni da radiazione causano una riduzione della vita dei cristalli
- Si osserva questo sia come riduzione dell'angolo massimo di diffrazione sia dal peggioramento del profilo dei singoli riflessi.
- Si possono rompere i ponti disolfuro e si possono perdere i gruppi carbossilici di acido aspartico o glutammico esposti
- I danni dipendono dalla dose dei raggi X assorbita e dall'energia dei fotoni ricevuti.
- I raggi X promuovono la radiolisi delle molecole di acqua che può portare a danni nella proteina chimicamente generati dai radicali.
- Lo sviluppo dei radicali può essere ridotto congelando i cristalli della proteina a bassa temperatura (100 K)

Criocongelamento

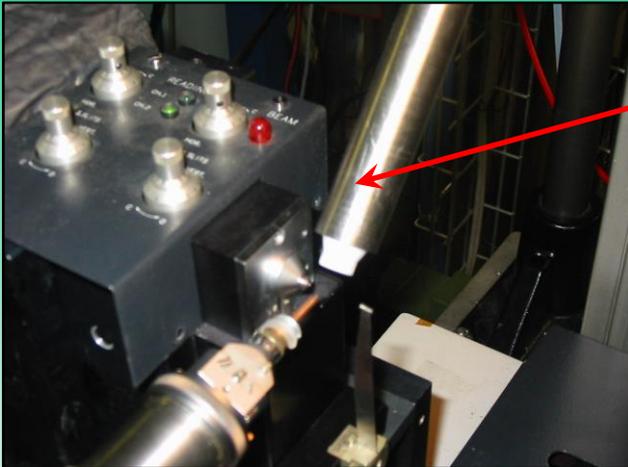
- Per evitare il decadimento si sottopone il cristallo a temperature molto basse per esempio usando un flusso di N_2 liquido (tipicamente a 100K).
- Prima del congelamento è necessario aggiungere al liquido madre un crioprotettore ossia una sostanza che alle basse temperature forma un vetro amorfo, impedendo la formazione di cristalli di ghiaccio che danneggerebbero il cristallo. Uno screening è effettuato utilizzando diversi crioprotettori a diverse concentrazioni per trovare le migliori condizioni.



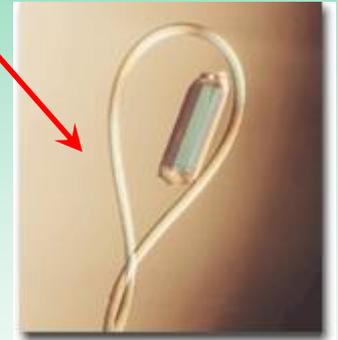
Il cristallo viene “pescato” in un loop di nylon di dimensione opportuna e velocemente immerso nel criostream



RACCOLTA DEI DATI DI DIFFRAZIONE: SISTEMA CRIOGENICO



- Raccolta dei dati di diffrazione a bassa temperatura grazie all'utilizzo di un sistema criogenico (flusso continuo di azoto a 100-150K)
- Prelievo dei cristalli dalle soluzioni di cristallizzazione per mezzo di anelli (loop) di nylon



Questo metodo permette di:

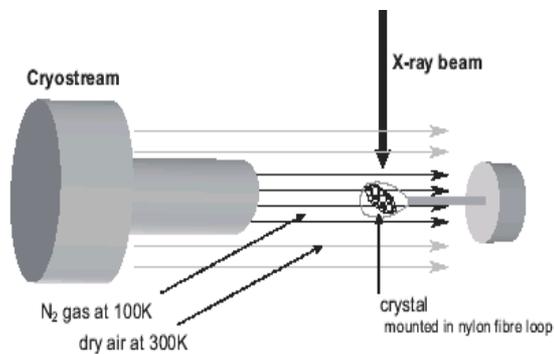
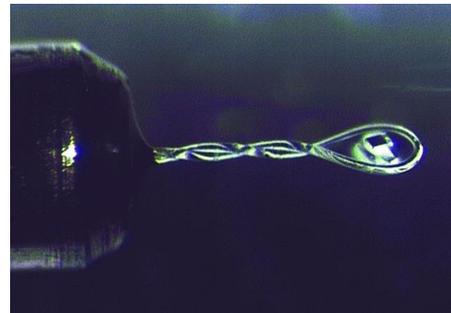
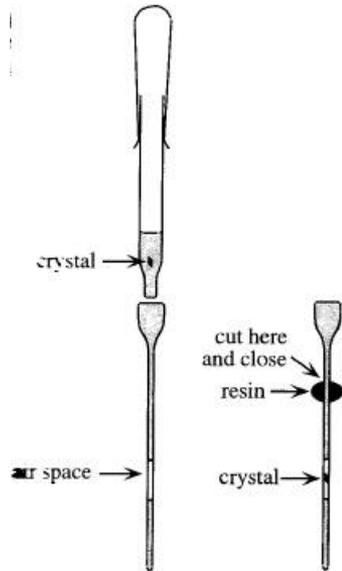
- prevenire il deterioramento del cristallo dovuto alla radiazione
- evitare la perdita di solvente dal cristallo
- ridurre i moti termici degli atomi

Estremamente importante la scelta del crioprotettore per evitare la formazione di ghiaccio

Montaggio dei cristalli

Montaggio in capillare di vetro

Montaggio mediante loop



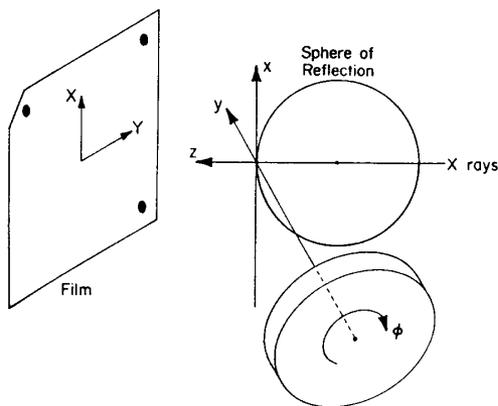
Testina goniometrica

Metodi di Raccolta Dati

- I diversi metodi dipendono da
 - Monocromaticità o no della luce
 - La geometria di raccolta dati
 - Il tipo di detector, mono o bidimensionale
- Policromatica
 - Metodo Laue
- Monocromatica
 - Metodo del Cristallo Rotante

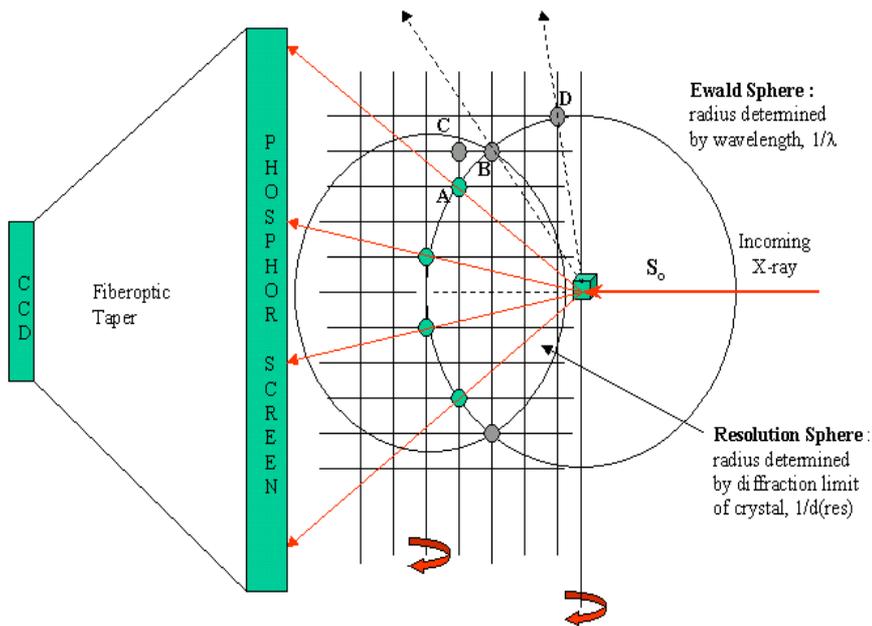
Metodo del Cristallo Rotante

- Il cristallo viene ruotato intorno ad un asse generico in modo da portare in diffrazione un certo numero di riflessi
- E' il metodo standard della raccolta di dati per le macromolecole



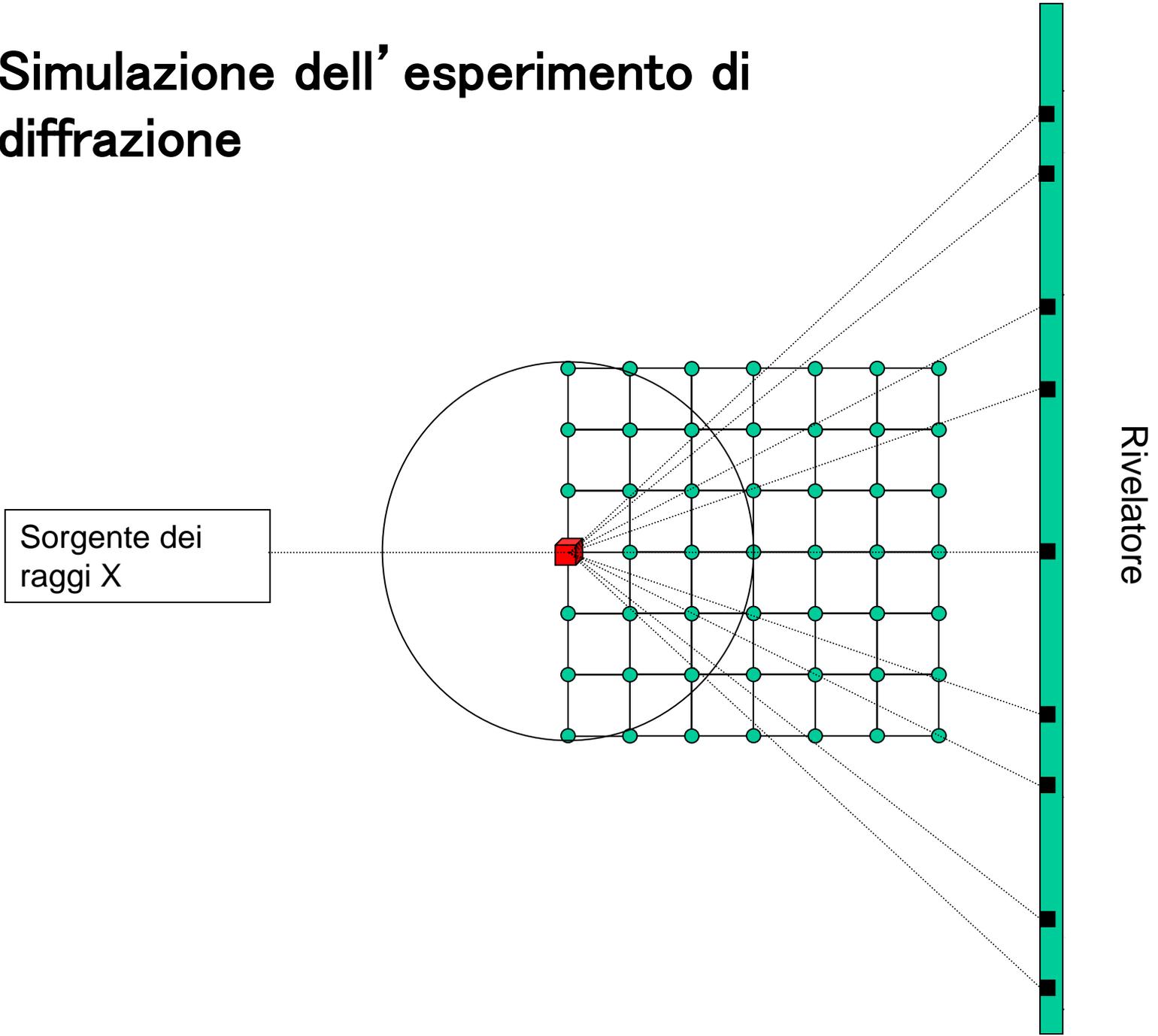
- Il setup più semplice consiste in un fascio di raggi X monocromatico un goniometro con un singolo asse di rotazione ortogonale al fascio incidente e un rivelatore piano bidimensionale. Il rivelatore è normalmente posto in modo parallelo all'asse di rotazione e ortogonale al fascio incidente.

Geometria



- Il cristallo viene ruotato intorno all'asse del goniometro di determinato angolo
- I raggi X diffratti sono raccolti dal rivelatore dietro il cristallo
- La rotazione è ripetuta per intervalli di angoli contigui fino che tutto la parte indipendente del reticolo reciproco viene esplorata

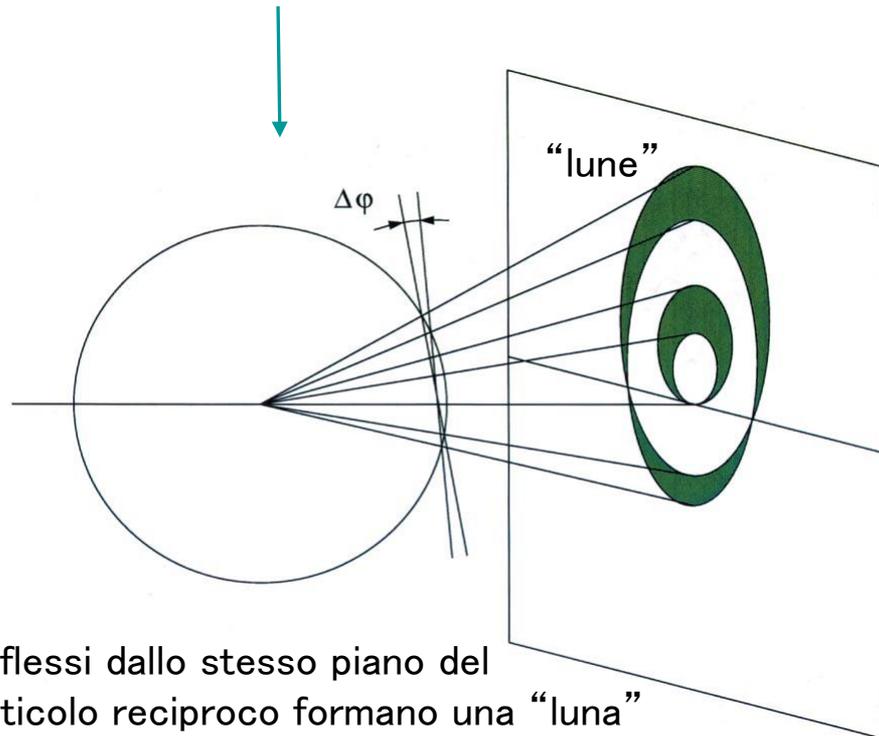
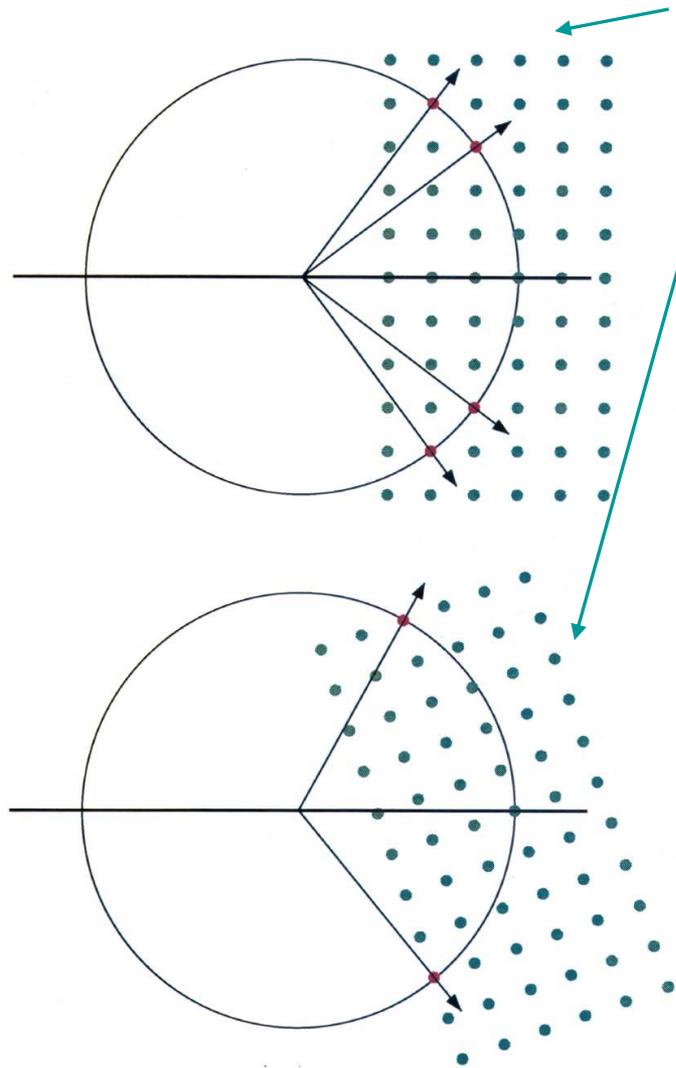
Simulazione dell' esperimento di diffrazione



Metodo di rotazione

Per una particolare orientazione del cristallo solo alcuni riflessi saranno in posizione di diffrazione.

Per misurare più riflessi il cristallo è ruotato (e con esso il suo reticolo reciproco) intorno ad un singolo asse per un angolo di oscillazione $\Delta\varphi$ durante il quale si registra l'immagine di diffrazione sul rivelatore. La rotazione è ripetuta per $\Delta\varphi$ contigui finché, data l'orientazione del cristallo, almeno l'unità asimmetrica del reticolo reciproco è completamente raccolta.



Riflessi dallo stesso piano del reticolo reciproco formano una "luna"

Obiettivi di una raccolta dati

Massimizzare il numero di riflessi ad alto angolo (**massima risoluzione**)

Alta completezza dei dati → % dei riflessi misurati rispetto a quelli teorici contenuti nell'unità asimmetrica del reticolo reciproco.

Tale unità asimmetrica è definita dalla simmetria del gruppo spaziale del cristallo + centro di inversione (legge di Friedel) – riflessi unici.

Il numero di riflessi dipenderà anche dalla risoluzione effettiva (d) cui diffrange il cristallo ($N \propto 1/d^3$).

Alta ridondanza → Il riflesso hkl o i riflessi ad esso relazionati per simmetria (stessa intensità) sono misurati più volte per migliorare l'accuratezza della misura

Alto rapporto segnale/fondo : $I_{hkl}/\sigma(I_{hkl})$

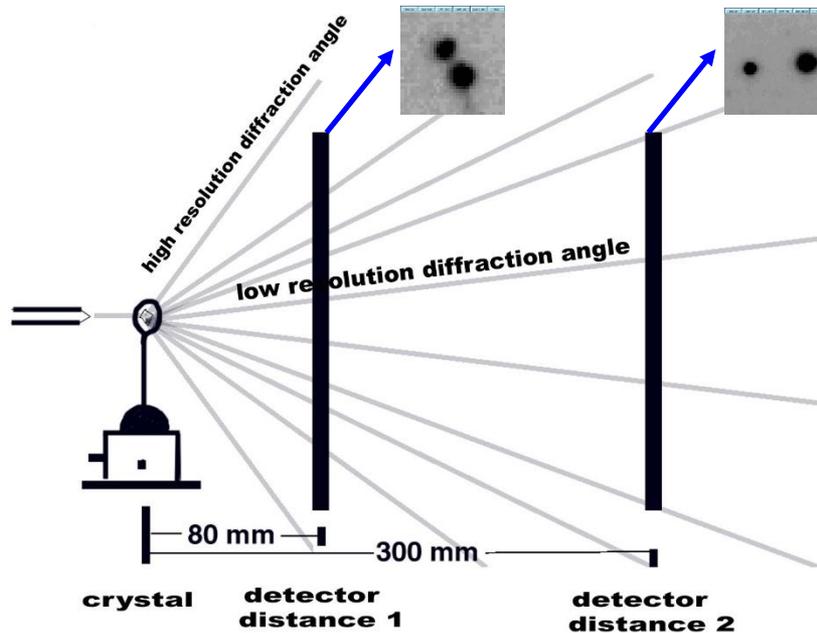
Fasi della raccolta dati

1. Messa a punto dei parametri della raccolta dati
2. Indicizzazione
3. Integrazione dei riflessi
4. Scalaggio e analisi della qualità dei dati

Parametri della raccolta dati

- ✓ Lunghezza d'onda
- ✓ Distanza cristallo-detector
- ✓ Angolo di oscillazione $\Delta\varphi$
- ✓ Tempo di esposizione
- ✓ Intervallo di rotazione totale

Distanza cristallo-detector (D)



Quanto più vicino è il detector, tanto maggiore è l'angolo di Bragg intercettato dal detector stesso



Bisogna valutare la massima *risoluzione* effettiva cui diffrange il cristallo

Altri fattori da considerare:

Possibile sovrapposizione degli spot

Aumentando D, aumenta la distanza tra gli spot (importante per celle elementari con assi lunghi)

Assorbimento dei raggi X da parte dell'aria (soprattutto nel caso di raccolte "in-house")

Aumentando D, aumenta l'assorbimento e dunque diminuisce l'intensità

Rapporto segnale/fondo

Aumentando D, aumenta rapporto segnale/fondo perchè diminuisce lo scattering del background misurato (scattering random da parte dell'aria, del materiale che costituisce il "montaggio", scattering anelastico del cristallo)

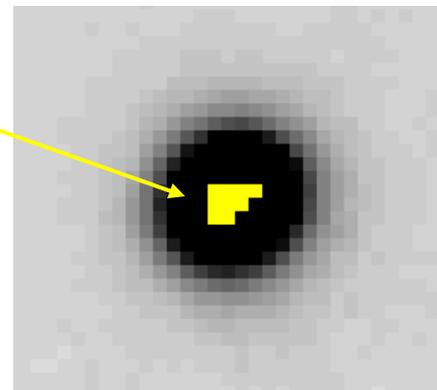
Tempo di esposizione

In teoria, quanto maggiore è il tempo di esposizione tanto maggiore è l'intensità diffratta e maggiore è il rapporto $I_{hkl}/\sigma(I_{hkl}) \Rightarrow$ misura più accurata

[In un esperimento di diffrazione si “conta” il numero dei fotoni che incidono sui pixel del rivelatore in un dato ammontare di tempo. Questo è un processo regolato da leggi probabilistiche: distribuzione di Poisson, detta anche “statistica dei conteggi”. La deviazione standard di una variabile che presenta una distribuzione di Poisson è data dalla radice quadrata del numero di conteggi misurato. Dunque se l'intensità raddoppia ($2I_{hkl}$) per effetto del più lungo tempo di esposizione, la sua deviazione standard $\sigma(I_{hkl})$ diventerà $\sqrt{2I_{hkl}}$ e il rapporto I/σ aumenterà di $\sqrt{2}$.]

In pratica ci sono altri fattori da considerare nella scelta del tempo di esposizione:

1. danneggiamento da radiazione, nel caso di raccolte dati a temperatura ambiente o anche nel caso di basse temperature ma usando linee di sincrotrone molto intense
2. “overloads”, ossia riflessi che vanno in saturazione (i rivelatori hanno un range dinamico, ossia esiste un numero di conteggi (fotoni) che satura i pixel del detector)
3. limitazioni di tempo a disposizione per la raccolta dati



Tipici tempi di esposizione per immagine (con $\Delta\varphi=1^\circ$) variano da 15–30 min con un detector “image plate” su sorgenti convenzionali, a pochi secondi con un detector CCD su sorgenti di sincrotrone

Intervallo angolare di rotazione totale

Il minimo intervallo di gradi di rotazione da ricoprire è dettato dalla simmetria del gruppo spaziale del cristallo e dall'orientazione del cristallo rispetto al fascio dei raggi X.

Nel caso in cui non si misura segnale anomalo (la legge di Friedel e' valida), il minimo intervallo necessario non può essere maggiore di 180° .

Rotation range ($^\circ$) required to collect a complete data set in different crystal classes.

The direction of the spindle axis is given in parentheses; *ac* means any vector in the *ac* plane.

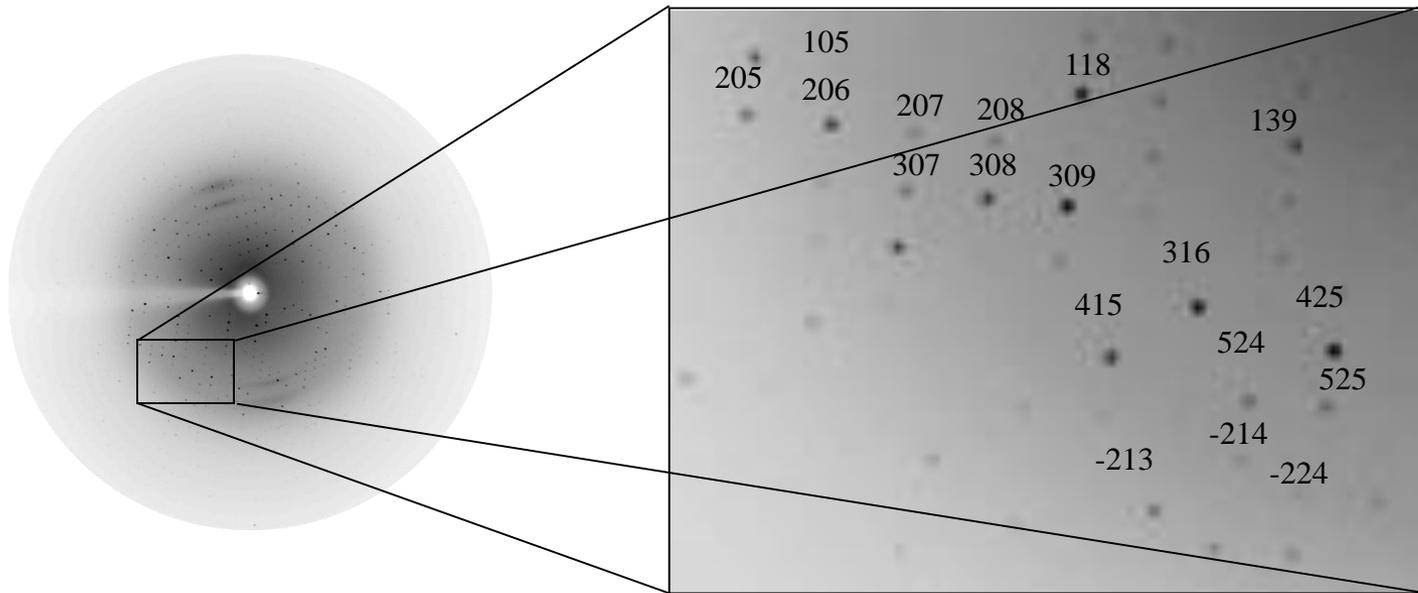
Point group	Native data	Anomalous data
1	180 (any)	$180 + 2\theta_{\max}$ (any)
2	180 (<i>b</i>); 90 (<i>ac</i>)	180 (<i>b</i>); $180 + 2\theta_{\max}$ (<i>ac</i>)
222	90 (<i>ab</i> or <i>ac</i> or <i>bc</i>)	90 (<i>ab</i> or <i>ac</i> or <i>bc</i>)
4	90 (<i>c</i> or <i>ab</i>)	90 (<i>c</i>); $90 + \theta_{\max}$ (<i>ab</i>)
422	45 (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)	45 (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)
3	60 (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)	$60 + 2\theta_{\max}$ (<i>c</i>); $90 + \theta_{\max}$ (<i>ab</i>)
32	30 (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)	$30 + \theta_{\max}$ (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)
6	60 (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)	60 (<i>c</i>); $90 + \theta_{\max}$ (<i>ab</i>)
622	30 (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)	30 (<i>c</i>); 90 (<i>ab</i>)
23	~60	~70
432	~35	~45

Se il cristallo non presenta un sensibile decadimento per esposizione ai raggi X, la acquisizione di misure ridondanti migliora la qualità del set di dati

Riduzione dati

Indicizzazione

Indicizzazione dei riflessi: ogni spot è associato ad un punto del reticolo reciproco hkl . Si determina così l'orientazione del cristallo rispetto ad una terna di assi di riferimento e le dimensioni della cella elementare

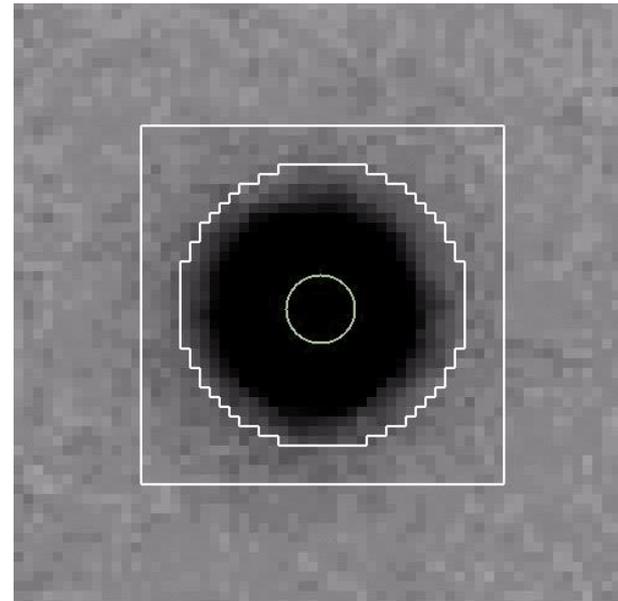


Integrazione

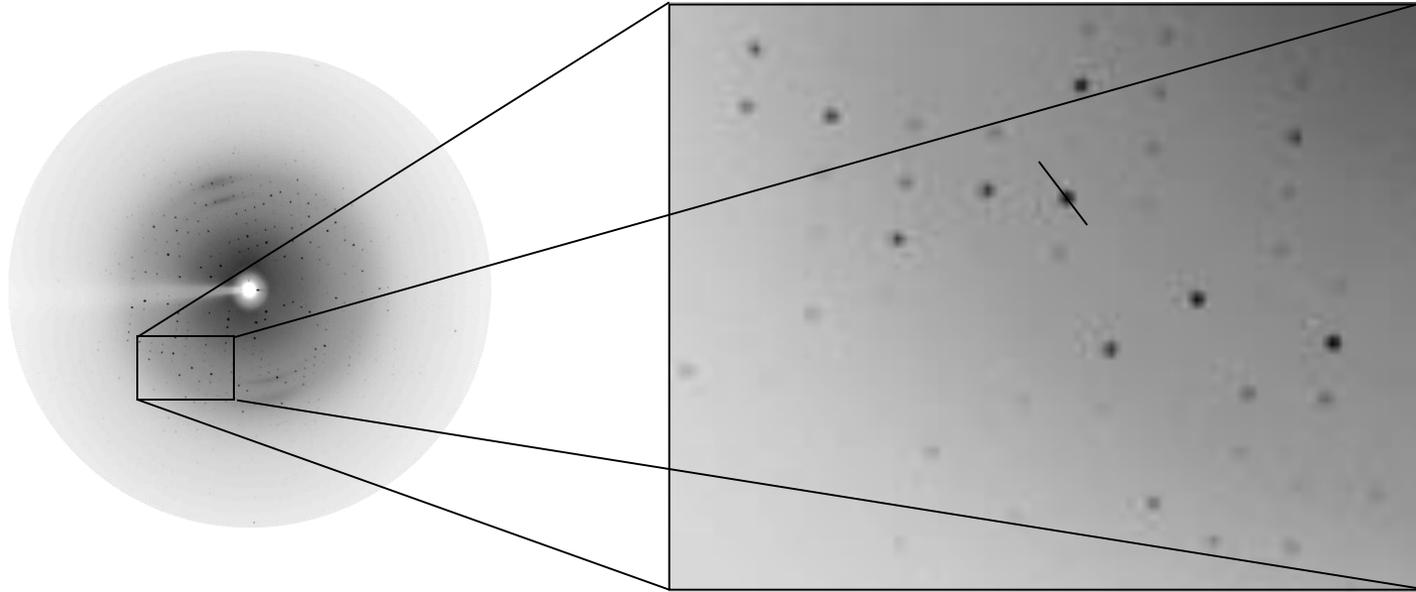
Si integrano le intensità dei riflessi

177	227	251	295	340	395	415	427	426	393	347	302	272	229	191	16
224	267	331	417	465	545	600	623	604	550	483	410	344	266	223	18
272	328	417	516	586	676	746	746	676	586	516	417	328	257	21	
311	406	570	751	938	1164	1331	1394	1394	1331	1164	938	751	522	23	
355	476	701	1025	1504	2157	3188	5016	4954	2807	1473	967	640	446	324	24
408	585	863	1424	2337	4327	9213	15967	14364	5941	2275	1263	783	512	362	28
464	673	1042	1827	7938	65535	65535	65535	63761	40588	6747	1543	892	559	397	30
494	1526	15375	22311	30555	65535	65535	65535	65535	65535	43388	15001	939	600	414	31
474	1578	16522	25439	30976	65535	65535	65535	65535	65535	27563	935	585	411	31	
431	631	945	1997	2833	6565	17171	18150	10598	4486	2338	1352	846	542	379	29
387	543	779	1215	1870	2770	3662	3903	3304	2331	1554	1052	715	472	337	26
338	463	609	918	1202	1606	1851	1926	1764	1411	1060	788	585	423	304	23
290	378	480	640	815	1013	1121	1140	1055	903	746	590	451	345	273	21
252	302	397	474	566	682	725	746	707	612	523	433	334	295	224	19
220	259	285	358	410	443	474	483	469	437	397	360	262	220	170	15
173	209	234	271	311	340	355	358	340	303	265	242	206	185	157	13

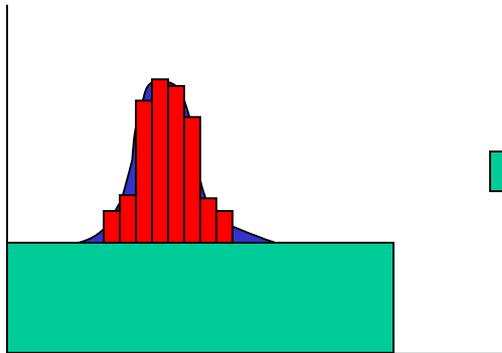
Intensità dei pixel che costituiscono il riflesso



Intensità di diffrazione:



Integrazione



H	K	L	I	Sig(I)
0	1	3	693.4	39.2
0	1	4	258.6	62.9
0	1	5	2310.4	125.4
0	1	31	33.9	188.5
0	2	3	3283.5	237.9
0	2	5	985.1	64.4
0	2	6	63600.6	1984.4
0	2	7	6747.0	245.8

⋮
⋮
⋮

$$I(h, k, l) \propto F(h, k, l)^2$$

Scalatura e Merging

- Tutti i punti integrati dalle differenti immagini sono messi su una scala comune.
- Le riflessioni parziali (la cui intensità viene raccolta in più immagini) sono sommate insieme.
- Le riflessioni riferite per simmetria vengono mediate

Si ottiene un dataset finale che sarà utilizzato per i successivi step della determinazione della struttura tridimensionale della macromolecola.

QUALITA' DEI DATI

Numero dei riflessi unici (riflessi indipendenti)

Numero totali dei dati raccolti

La consistenza interna (R_{merge})

La completezza (funzione dei dati teorici)

Il numero (o frazione) delle misure rigettate dalla statistica

L'Intensità media / deviazioni standard

RISOLUZIONE $d_{\text{min}} = \lambda / 2 \sin \theta_{\text{max}}$

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} | \langle I(hkl) \rangle |}$$

In generale, quanto minore è l' R_{merge} tanto migliore è il set di dati, ma bisogna ricordare che questo indice è influenzato dalla ridondanza dei dati (aumenta all'aumentare della ridondanza).