



Universidad de Chile
Vicerrectoría de asuntos académicos
Programa Académico de bachillerato

LA CRISTALOGRAFÍA, UNA RESEÑA HISTÓRICA
Monografía para la obtención del grado académico
de Bachiller en Ciencias Naturales y Exactas

Autora

Yamila Olivares González

Director y corrector

Dr. Antonio Galdámez

Laboratorio de Química de Sólidos, Facultad de Ciencias

Santiago, Chile 11 de diciembre

Índice

Resumen	2
Introducción	3
Cristalografía de rayos X: La historia	5
Cristalografía con Rayos X: El proceso	10
Cristalografía macromolecular: Radiación de Sincrotrón	13
Difracción con Neutrones	17
Criomicroscopía electrónica : una técnica sin monocristales	18
Nacimiento de la criomicroscopía electrónica y premio nobel 2017	21
Reflexiones finales	25
Referencias.....	26

Resumen

Con el descubrimiento de los rayos X en 1895, se abrió un nuevo mundo, el mundo de las estructuras moleculares. La cristalografía que usaba los rayos X tuvo un progreso enorme a pesar de los problemas que tenía esta técnica: metodologías de cristalización, nivel de los cálculos para determinar la estructura y problema de la fase, que con la ayuda de principios físicos y metodologías computacionales fueron superados. La cristalografía no sólo repercutió en la Física y Química sino también en la Biología, puesto que se pudo conocer la estructura de muchas proteínas y enzimas, incluyendo al ribosoma.

Más tarde, con el descubrimiento de la difracción de electrones y la invención del microscopio electrónico en 1934, se aumentó aún más la resolución de las estructuras cristalinas. Sin embargo, la difracción de electrones presentaba dificultades; las cuales se resolvieron con la creación de nuevas técnicas y avances tanto a nivel de los microscopios utilizados, como de software especializados en la determinación estructural. Todo lo anterior decantó en la criomicroscopía electrónica, y en este año, una nueva técnica que sería crucial para la determinación de estructuras de moléculas pequeñas llamada “criomicroscopía electrónica por difracción de electrones”.

***Palabras clave:** Difracción, Microscopía electrónica, cristalografía, criomicroscopía electrónica.*

Introducción

Al escuchar la palabra cristalografía, a la mayoría se le viene a la mente la idea o la imagen de un cristal. Por ejemplo, un diminuto copo de nieve. Otros tal vez pensarán en los pequeños cubos de azúcar al momento de preparar el café de la mañana, o en la sal cuando cocinamos. Incluso algunos esbozarán en su mente la imagen de un zircón o un diamante, en alguna joya. Tal como muchos imaginan, la cristalografía es una técnica que se encuentra en estrecha relación a los cristales, sin embargo, no es los que imaginamos y estos cristales deben pasar por un tratamiento especial para ser utilizados.

El año 2014 marca un hito a nivel mundial, además de conmemorar los cien años del descubrimiento de los rayos X, fue el año internacional de la cristalografía organizado por la UNESCO y la Unión Internacional de Cristalografía (IUCr) (Unesco, 2014). Durante ese año, se instó a los gobiernos a destinar más recursos a la investigación de la cristalografía y a tener un centro cristalográfico a nivel nacional. Además de poder integrar y fomentar esta área de conocimiento en escuelas y universidades, por medio de laboratorios móviles con demostraciones de experimentos cristalográficos (Unesco, 2014); también se buscó dar a conocer entre el público general, no necesariamente científico, las ventajas que supone la cristalografía para el desarrollo tecnológico en diversas áreas, desde la confección de ropa térmica, preparación de helados hasta las estructuras cristalizadas de proteínas. Para poder llegar a un público mayor se realizaron una serie de charlas dirigidas por miembros de la IUCr. En el ámbito científico, se dio pie al lanzamiento la revista IUCrJ (International Union of Crystallography Journal), por sus siglas en inglés. A través de esta revista se podía tener registro de todos los datos obtenidos de grandes centros cristalográficos, además de fomentar la participación internacional en trabajos científicos.

En los párrafos anteriores se ha hablado de la cristalografía; sin embargo, surge la interrogante ¿Qué es la cristalografía? ¿Cuál es su impacto?. Con el fin de responder a estas preguntas se abordará la historia de la cristalografía, cuál es su origen y cómo esta ha ido evolucionando a lo largo del tiempo; desde el hito base que fue el descubrimiento de los rayos X. Dicha historia se construirá por medio de los aportes de destacados científicos cuyos descubrimientos fueron galardonados con premios Nobel en la Química ó Física. De esta

forma, se conocerá como esta disciplina ha cambiado desde el uso de los rayos x en sus comienzos, agregando una breve reseña de la difracción de neutrones y el uso de la radiación de sincrotrón para la determinación estructural de proteínas, llegando a la criomicroscopía electrónica.

CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X: LA HISTORIA

Premio Nobel 1901: Descubrimiento de los rayos X

“En pocos minutos no hubo dudas sobre ello. Los rayos que salían del tubo tenían un efecto luminiscente en el papel. Lo he probado con éxito a distancias cada vez mayores, incluso a dos metros. En principio parecía una nueva clase de luz invisible. Era claramente algo nuevo, algo no registrado” (Roentgen, 1896, p.414).

Todo surge con el descubrimiento de los rayos X, un 8 de noviembre de 1895, por Wilhelm Roentgen en colaboración con su esposa, Anna Bertha Roentgen. Wilhelm ingeniero mecánico y profesor de física de nacionalidad alemana, se encontraba en su laboratorio como de costumbre, experimentando con un tubo de rayos catódicos, cuando algo llamó su atención. Al pasar corriente por el tubo, recubierto con trozos de cartón negro para disminuir la luminosidad, se produjo al instante una luz fluorescente sobre una pantalla de Platino-Cianuro de Bario, $\text{BaPt}(\text{CN})_4$, que se encontraba cerca (Ulloa, 1995). El montaje experimental usado se puede ver en la Figura 1.

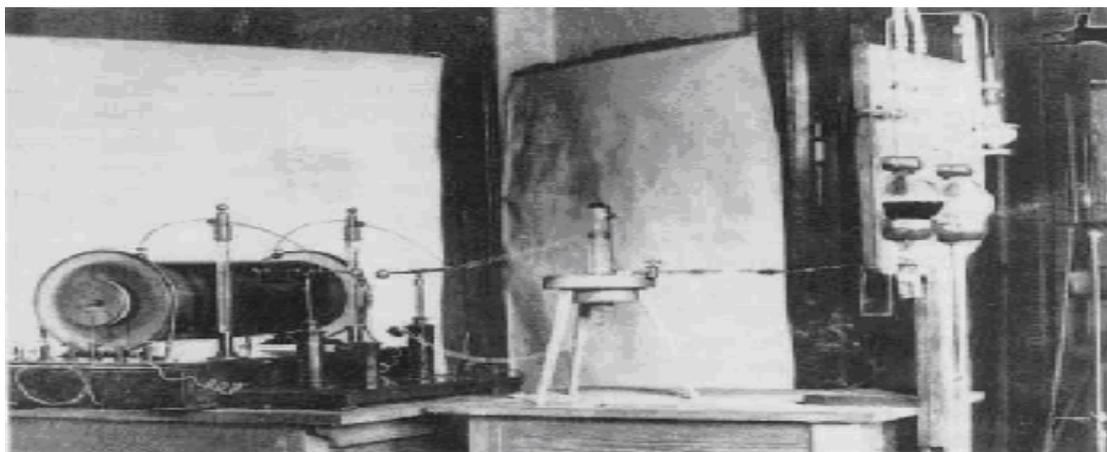


Figura 1. Tubo de rayos catódicos y pantalla de Platino-Cianuro de Bario, Laboratorio de Wilhelm Roentgen, 1895.

Desconcertado por lo que sucedía, aumentó la distancia con la pantalla e incluso puso objetos entre el tubo y ésta. Sin embargo, obtuvo el mismo resultado. Roentgen estaba sorprendido ante la vista de la sombra de sus huesos y tejidos en la pantalla fluorescente.

Extasiado por su descubrimiento, pidió a Anna, su esposa, que situara su mano izquierda en una placa fotográfica. Luego de casi 15 minutos se obtuvo la primera radiografía del mundo (García, 2005), como se ilustra en la Figura 2. Como Roentgen desconocía hasta



ese minuto la naturaleza de esos rayos, los denominó rayos X. Por este descubrimiento fue galardonado en 1901 con el premio nobel de Física.

Figura 2. Primera radiografía del mundo, mano izquierda de Anna Bertha Roentgen, 1895.

Premio Nobel 1914: Difracción de rayos X

Años después, en mayo de 1912, Max Von Laue junto a Walter Friedrich y Paul Knipping, realizaron un experimento de difracción de rayos X por medio de un cristal, a fin de demostrar si los átomos presentes en éstos últimos (cristales) , “(...) *se acomodaban según una ordenación periódica tridimensional* (Bernalte, 1997, p.75)”.

Von Laue pensaba que el cristal podría servir como una red tridimensional, con separaciones de 1 \AA ($\text{\AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$), similar a la rejilla clásica usada para hacer difracción del espectro visible; pero usando ahora los rayos X. Además según Sommerfeld, un físico alemán, la longitud de los rayos x eran cercanas a una décimas de \AA (Bernalte, 1997).

Para el experimento se realizó un montaje simple, que consistió en un monocristal de Sulfato de Cobre (CuSO_4) donado por Paul Von Groth, una eminencia en la cristalografía de la época), que se colocó sobre una cabeza goniométrica y recibió por medio de colimador, un haz de aproximadamente 1 mm de sección transversal de un tubo de rayos X suministrado por Roentgen (Bernalte, 1997). Al otro lado del tubo, se instalaron placas fotográficas a diferentes distancias (ver Figura 3).

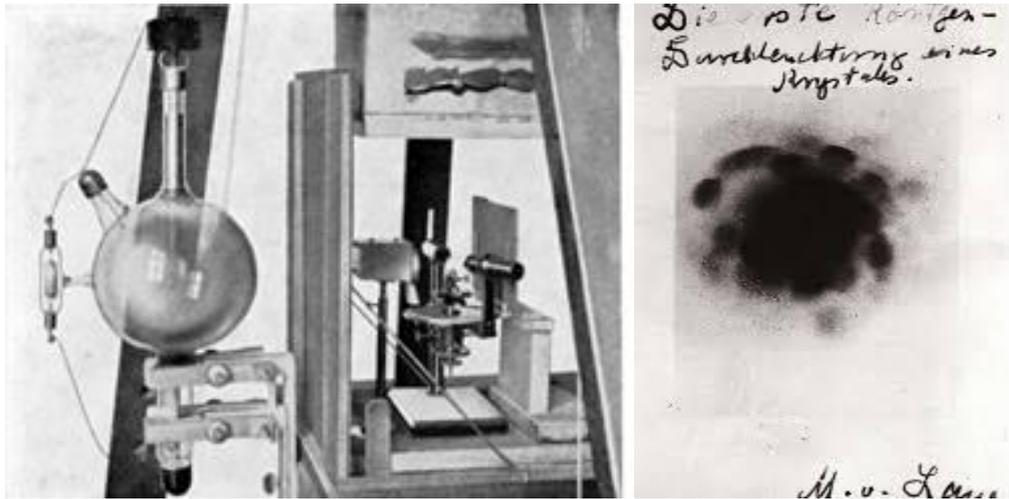


Figura 3. (Izquierda) Equipo de difracción usado por Max von Laue, en donde se distingue el tubo de rayos X (ampolla de vidrio), el sistema de montaje del cristal con un microscopio, y una placa fotográfica perpendicular a la dirección de los rayos X. (derecha) Fotografía que muestra los grupos de manchas producidos por haces difractados, que atravesaron el monocristal de sulfato de cobre, 1912 .

Los resultados del experimento, fueron una revolución para el mundo científico; pues a la vez que se comprobaba la estructura periódica de los átomos o moléculas que componían al cristal (ver Figura 3), se confirmaba la naturaleza ondulatoria de los rayos X (Bernalte 1997). Debido a la difracción de rayos x con cristales, Von Laue se hizo merecedor del premio nobel de Física en 1914.

Premio Nobel 1915: Inicio de la cristalografía de rayos X

Al tiempo que Von Laue, Friedrich y Knipping realizaban experimentos de difracción, obteniendo como resultado la prueba de que la naturaleza real de los rayos X era ondulatoria, William Henry Bragg y su hijo William Lawrence Bragg, dos físicos británicos, se esforzaban por demostrar que la naturaleza real era corpuscular. Para ello decidieron replicar los experimentos de Von Laue, obteniendo un método con el cual a partir del patrón de difracción de rayos X, encontrar la posición de los átomos en el cristal (Perles,2015). Sin embargo, ellos establecieron que “(...)cada uno de los puntos discretos que se observan en un patrón de difracción contiene información de todos los átomos que forman parte de una familia de planos (Perles, 2015, p.991)”. Esto implica que cada uno de los “puntos luminosos” que se observaban en la radiografía, correspondían a la suma de las interferencias constructivas entre las ondas, que se originan en cada átomo situado en los diferentes planos. Lo anterior, por la interacción de los rayos X con sus electrones, en específico con su nube electrónica (Perles, 2015). Por ello saber la posición de los átomos en el cristal, resultaba una tarea titánica.

Bragg, consideró al cristal no como un cúmulo de átomos ordenados, sino más bien como “(...) un conjunto ordenado de familias de planos paralelos entre sí (Perles, 2015, p.991)”, de esta forma todo se facilitó. Así la Ley de Bragg, se enuncia con la siguiente ecuación:

$$n\lambda = 2d \text{ sen } \theta$$

Dónde:

n = Número entero positivo.

λ =Longitud de onda, de radiación que incide.

d = Distancia en medio de los planos que forman una familia.

θ = La mitad del ángulo que se forma entre el rayo difractado con el incidente .

La ley implica “(...)la condición que debe cumplir una familia de planos para dar lugar a una interferencia constructiva, y que tendrá como consecuencia un punto de luz en el patrón de difracción (Perles, 2015, p.991)”.

Lo anterior se puede resumir a través de una ilustración, que corresponde a la Figura 4, donde se observa primero la estructura de la sal cloruro de sodio (NaCl) y luego la interferencia constructiva que cumple la ley de Bragg y por último, la interferencia destructiva con las ondas anulándose entre sí.

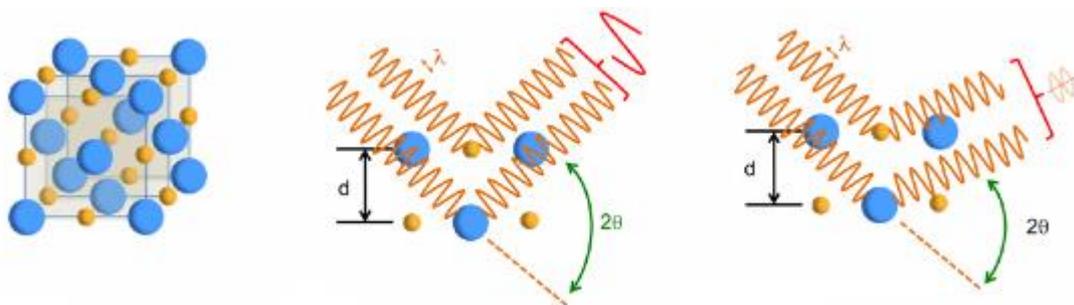


Figura 4.(Izquierda) Estructura de NaCl como planos paralelos. Esferas azules representan Na y amarillas Cl.(centro) Los planos que cumplen la condición de la ley de Bragg, se produce interferencia constructiva.(Derecha) Si la condición de la ley de Bragg no se cumple, se produce interferencia destructiva, es decir las ondas se anulan.

De esta forma, los Bragg pudieron determinar con bastante precisión la posición que tenían los átomos en un cristal y así conocer su estructura tridimensional (Rabinovich, 2014).

En 1913, se describieron por primera vez las estructuras de los cristales de cloruro de sodio y potasio. Estos resultados fueron publicado en la revista Proceedings of the Royal Society of London, este hito suele marcar “(...)el origen de la cristalografía de rayos X como la principal técnica experimental para el estudio de la estructura de la materia a nivel atómico o molecular (Rabinovich, 2014, p.8)” .

Por el uso de rayos X para determinar la estructura de los cristales, les fue otorgado el premio nobel de Física en 1915. Tanto fue el revuelo que causaron las investigaciones de Max Von Laue y los Bragg que años después se emitieron estampillas en Europa con sus rostros, acompañados de las estructuras cristalinas o patrones de difracción (ver Figura 5).

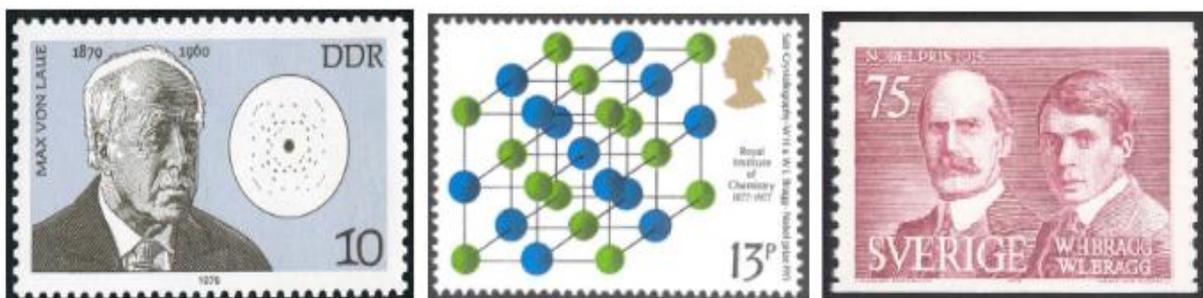


Figura 5. (Izquierda) Max Von Laue junto a la fotografía de la difracción de rayos X de un cristal de blenda de cinc o esfalerita (SZn). (centro) Estampilla con la estructura de NaCl, en conmemoración de los 100 años de la Real Sociedad Química. (derecha). William Bragg padre e hijo, siglo XIX.

CRISTALOGRAFÍA CON RAYOS X: EL PROCESO

Como fue descrito anteriormente, el experimento de los Bragg fue el origen de la cristalografía de rayos X para determinar la estructura de la materia. Ahora se verá el proceso cristalográfico, para luego exponer algunos premios nobeles que ayudaron a resolver los problemas fundamentales de la cristalografía. Finalmente, se expondrá brevemente el uso de la radiación de sincrotrón en la determinación estructural de macromoléculas, la difracción de neutrones para establecer la estructura magnética y un par de aplicaciones de la cristalografía de rayos x.

Obtención de los cristales

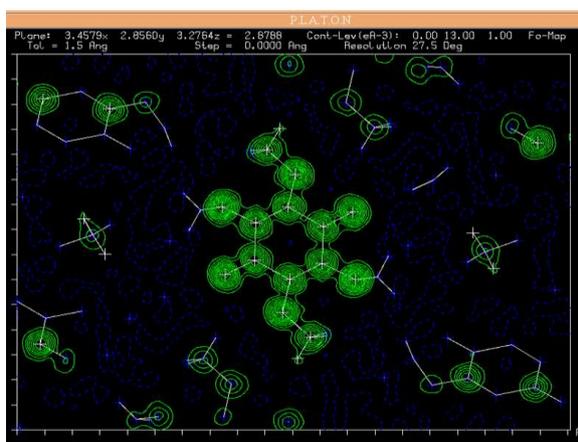
Los cristales se pueden definir como un *“arreglo repetitivo y periódico de la molécula o complejo con la misma orientación relativa (Rodríguez,2018, p. 19)”*. Además, en la página de la IUCr enuncia *“Un material es un cristal si tiene esencialmente un patrón de difracción afilado. La palabra esencialmente significa que la mayor parte de la intensidad de la difracción se concentra en picos de Bragg relativamente agudos, además de la dispersión difusa siempre presente (...)”*. Estos cristales poseen una estructura química organizada según una red cristalina, cuya unidad básica es la celda unitaria.

Ahora bien, para obtener cristales, es necesario que estén condiciones óptimas para su crecimiento; para ello existen diversos tratamientos dependiendo de la naturaleza de la sustancia. Por ejemplo, si es una sustancia inorgánica se puede sobresaturar la muestra con ayuda de algunos agentes químicos, y luego traspasarlo en una placa de petri donde se obtendrá un monocristal (Whelan et. al., 2018). Por otro lado, si es una proteína entonces el proceso es diferente. En un inicio hay que separar la proteína del lugar donde se encuentra, por ejemplo en una membrana celular o en citoplasma. Para ello se puede recurrir a detergentes especiales, y luego se procede a separar las proteínas por tamaño o por carga realizando una cromatografía en gel de poliacrilamida. Con la proteína ya separada, se debe cristalizar tomando en cuenta la temperatura, las mezclas de agentes precipitantes, en soluciones amortiguadoras con diferentes pH, iones y contraiones, entre otros. Hay varios métodos, entre estos se encuentra el uso de un robot de cristalización que realiza un goteo de la muestra, mientras que una cámara va registrando las gotas de cristalización y así puede

reconocer los cristales (Garman, 2014). Una vez obtenidos, los cristales con tamaño entre los 0,5 y 1 mm, deben ser montados en el portamuestra; para luego, situarlos en un goniómetro y comenzar con el proceso de medición.

Difracción de rayos X y estructura

En el fenómeno de difracción tendremos dos espacios. Por un lado está el *espacio real o directo* que corresponde al cristal, la celda unitaria, la estructura atómica y la densidad electrónica. Por otro lado, se encuentra el *espacio recíproco* donde está el patrón de difracción y los factores de estructura (Pickworth y Trueblood, 2010; Sands, 1993). La interacción entre los rayos X y el cristal, entrega como resultado un patrón de difracción, también llamado espacio recíproco. Este corresponde a una imagen con una ordenación de puntos negros, en una placa fotográfica (ver Figura 3), donde cada uno de estos representa una familia de planos. Para “transformar” la información del *espacio recíproco* al *espacio real o directo*;



donde se configura la estructura cristalina, se necesita conocer la densidad electrónica (ver Figura 6).

Figura 6. Mapa de densidad electrónica de una molécula aromática sustituida (extraída del programa PLATÓN: comunicación personal con el Dr. Galdámez).

De acuerdo a la teoría del fenómeno de difracción, esta última (densidad electrónica), es la transformada de Fourier de los factores de estructura, que corresponden a ondas difractadas, que al impactar una placa fotográfica, dejan marcas similares a puntos negros (patrón de difracción):

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl}^{+\infty} |F(hkl)| e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\varphi(hkl)]}$$

Ecuación. 1 Densidad electrónica (Pickworth y Trueblood, 2010; Sandes, 1993)

ρ es la densidad electrónica, V es el volumen de la celda unitaria, $F(hkl)$, representa los factores de estructura y hkl los planos cristalográficos. Los factores de estructura se componen de dos partes, $|F(hkl)|$ representa la amplitud de la onda difractada y φ la fase.

La intensidad de la reflexión de Bragg en un punto de la *red recíproca* se relaciona con el cuadrado de $F(hkl)$, es decir; $I \sim F^2$; donde los factores de estructura son una función de las coordenadas atómicas, factor de “scattering” f y del desplazamiento térmico: $F \sim [(x,y,z), f, U_{ij}]$. El factor de “scattering” f está relacionado a la identidad química; pues depende de la cantidad de electrones y el ángulo de dispersión del rayo que se incide. U_{ij} es el desplazamiento térmico que está asociado a la vibración térmica y desorden, y por último, (x,y,z) corresponde a las coordenadas atómicas (Pickworth y Trueblood, 2010; Sandes, 1993).

El problema principal que surge es que cuando usamos la intensidad, solo obtenemos el módulo de los factores de estructura durante el proceso experimental, y no podemos tener la fase de las ondas φ . De ahí viene el nombre del “problema de la fase” (Sands , 1993). Para resolver el problema de la fase, Arthur Patterson diseñó una función que en términos simples era similar a la densidad electrónica, pero entregaba un mapa de vectores de la posición de los átomos (posiciones relativas), las cuales si se interpretan correctamente podrían dar información sobre la fase, por ende era un método indirecto.

Años más tarde, tres estadounidenses; Jerome Karle e Isabella Karle dos químicos, junto Herbert Hauptmann matemático, diseñaron un método directo para la obtención de las fases, el cual se resume en el cálculo de diversos sistemas de ecuaciones a partir del módulo de los factores de estructura, normalizados. Por el desarrollo de los métodos directos Herbert Hauptman y Jerome Karle recibieron el premio nobel de Química en 1985.

Otros métodos que se utilizaron después fueron el método MIR o reemplazo isomorfo múltiple, el método MAD ó difracción anómala múltiple y el método MR de reemplazo molecular. Todo este proceso de cálculos los matemáticos, son resueltos a través de una computadora la que genera como resultado el mapa de densidad electrónica. Finalmente, el

proceso de resolución de una estructura conlleva varios pasos, los cuales podemos resumir en la Figura 7.

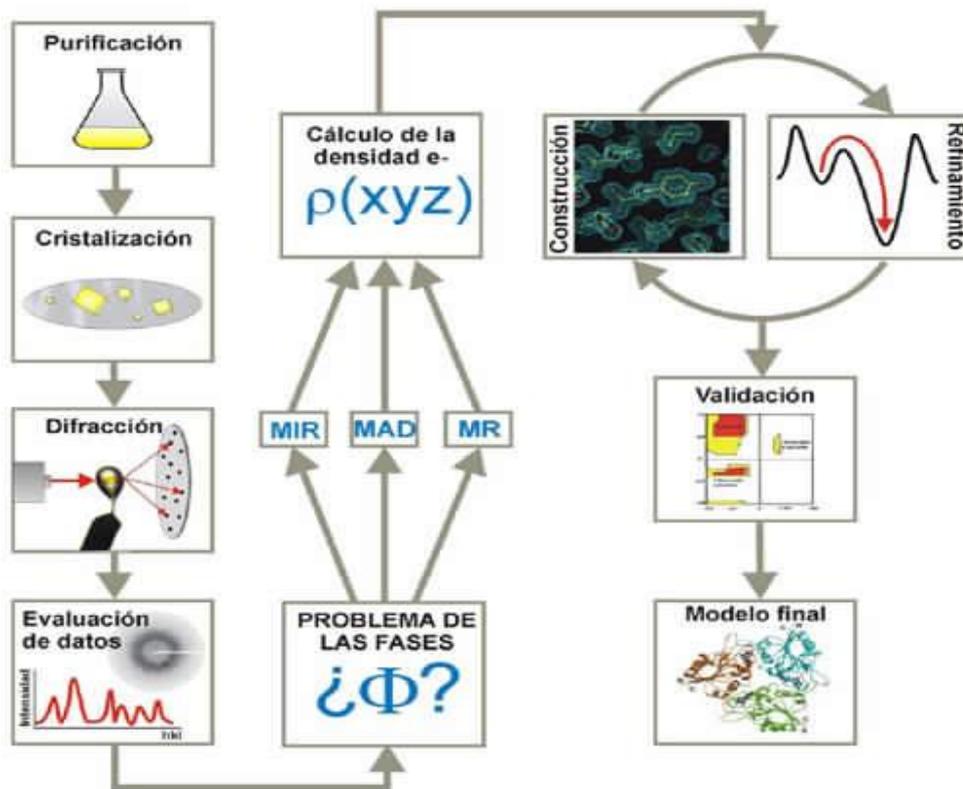


Figura 7. Resumen de proceso de resolución estructural de proteínas.

CRISTALOGRAFÍA MACROMOLECULAR: RADIACIÓN DE SINCROTRÓN

La cristalografía de proteínas ó macromolecular, es el método más efectivo para la determinación de estructuras biológicas “grandes”, como son las proteínas. Además, tiene injerencia en la determinación de la función biológica y el plegamiento proteico, el diseño de fármacos e incluso ayudar en la búsqueda de relaciones evolutivas. Para llevar a cabo esto, es necesario hacer la difracción de rayos X con cristales macromoleculares.

Ahora bien, los experimentos se realizan en fuentes de sincrotrón. Un sincrotrón es un acelerador de partículas. La radiación de sincrotrón es un tipo de radiación electromagnética que se emite por partículas, protones o electrones que viajan a casi 300.000 km/s , con muy alta energía mientras giran en un anillo de contención. La radiación de sincrotrón abarca un amplio espectro, desde el infrarrojo hasta los rayos X. Como las macromoléculas tienden a

formar cristales pequeños, irregulares y de débil difracción: “(...) con el aumento de brillo del sincrotrón se incrementa la precisión de la medida, debido a la velocidad de los electrones cercana a la luz” (Díaz, Fuentes, Romero y Ruiz, 2017 , p.59). Además, contribuye a las mediciones de Dispersión Anómala de Longitud de Onda Única (SAD) o Dispersión Anómala de Longitud de Onda Múltiple (MAD), ya que su longitud de onda es sintonizable acercándose a la longitud de absorción natural de los átomos de las macromoléculas, con esto se puede resolver el problema de la fase. Otras fuentes de energía u otros métodos tomarían días en la recolección de datos, la radiación de sincrotrón se demora minutos, por ello es que se usa para la determinación estructural de macromoléculas (ver Figura 8).



Figura 8. (Izquierda) Difractómetro lineal Hilger-Watts, usado para ayudar resolver la estructura de la lisozima en 1965, por medio de la recopilación de datos. (Centro) La primera fuente de sincrotrón de tercera generación de rayos x. (Derecha) Parte del proyecto Láser Europeo de Electrones Libres y Rayos X o XFEL por sus siglas en inglés.

Premio Nobel 1964: La estructura de la penicilina, vitamina B-12 e insulina

Dorothy Crowfoot, nació en el Cairo en 1910, su vida fue marcada por los cristales desde la infancia cuando en una clase de química, tuvo que sintetizar cristales de sulfato de cobre. Luego un libro de Bragg acerca de la difracción de rayos X, la acercaría aún más. Ad portas de entrar a la universidad, Dorothy se encontró con dos obstáculos; la forma de financiar sus estudios, sumado a la discriminación que existía hacia la mujer en las instituciones de educación superior. El primer obstáculo fue sorteado gracias a una tía contribuyó con el dinero; sin embargo, Dorothy Crowfoot no pudo ingresar a Oxford a seguir la tradición familiar, pues esta universidad muy conservadora no admitía en esa época a mujeres, por lo que terminó inscribiéndose en el College Somerville. En esta institución estudió, Química, Mineralogía y Cristalografía, ciencia aún reciente (Muñoz y Garritz, 2013).

Años después en Cambridge, en el Instituto Birkbeck, Dorothy Crowfoot recibió el desafío de encontrar la estructura de una proteína por parte de su profesor, John Desmond Bernal, un destacado cristalógrafo y científico. Gracias a esto, en 1934 Dorothy Crowfoot fue la primera en “fotografiar” cristales de la proteína pepsina. Pero no se detuvo ahí, siguió investigando la estructura de otras moléculas más complejas a través de la cristalografía con rayos X; lo que la llevó a descubrir la estructura de la penicilina (1944) y años más tarde la estructura de la vitamina B-12 (1956).

Por determinar distintas estructuras de compuestos orgánicos, le fue otorgado en el año 1964, el premio Nobel de Química (Muñoz y Garritz, 2013). Sin embargo, lo que marcó parte de su vida fue encontrar la estructura de la insulina. Inició con un primer difractograma en 1933, y luego de casi 35 años investigando, en 1969 finalmente pudo obtener la anhelada estructura (ver Figura 9).

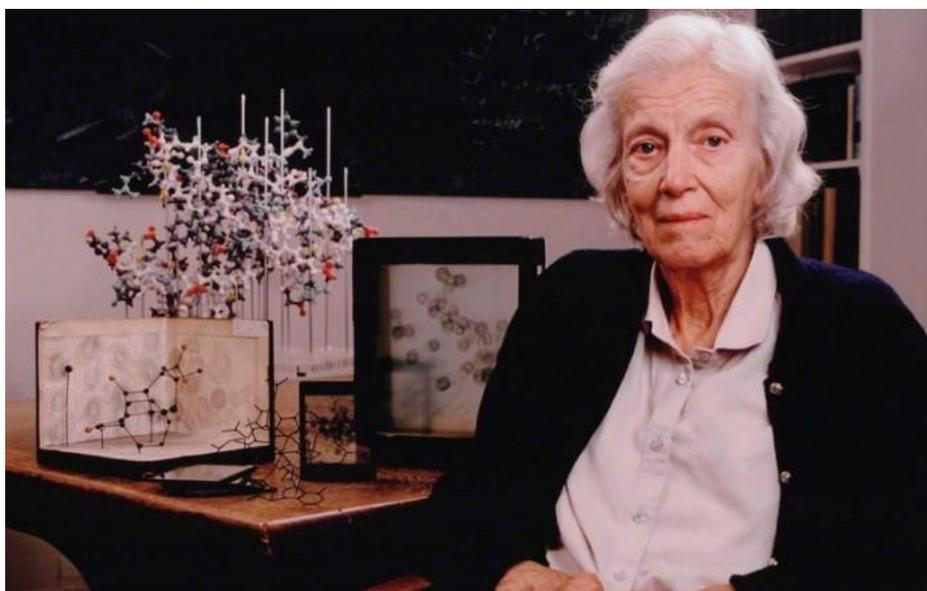


Figura 9. Dorothy C., junto a la estructura de varias proteínas, la más grande corresponde a la insulina, la esquina inferior derecha muestra a la penicilina.

Premio Nobel 2009: La estructura del ribosoma

En la década de los setenta, Ada Yonath, bioquímica del Instituto Weizmann (Israel) intentó descubrir la estructura del ribosoma usando la cristalografía con rayos X. A pesar de la dificultad que suponía obtener cristales útiles para obtener patrones más precisos, Ada Yonath

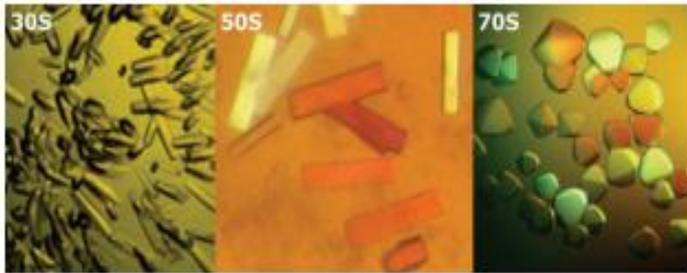


Figura 10. Cristales de ribosomas de 30,50 y 70 s de tamaño.

no se rindió y en colaboración con el Doctor H.G Wittmann, obtuvieron los primeros cristales de ribosomas. Pese a que su calidad no era la más óptima; fueron importantes para iniciar la investigación (ver Figura 10).

Ada Yonath, fue una científica que gracias a su osadía, nos permitió conocer la estructura del ribosoma. Sin embargo, en este viaje no estuvo sola, Thomas Steitz y Venkatraman Ramkrishnan, que seguían el enfoque de Ada contribuyeron a la investigación (Donkova y Sánchez, 2010). Thomas Steitz de la Universidad de Yale, era un biólogo estructural que se interesó por el problema que suscitaba el ribosoma. Junto a Peter Moore, utilizaron modelos obtenidos por criomicroscopía electrónica para resolver tópicos de orientación o fase angular de la estructura del ribosoma (Calisto y Fita, 2009).

En 1985, Yonath, Wittmann junto a otros científicos, obtuvieron cristales de ribosomas de *Haloarcula marismortui*, microorganismo que se encuentra en el Mar Muerto. Estos cristales sirvieron después para a determinación de la estructura de la subunidad mayor del ribosoma en el año 2000.

En 1998 Thomas Steitz publicó la primera estructura de la subunidad mayor del ribosoma. Venkatraman Ramakrishna, bioquímico y biofísico de la universidad de Ohio, fue el encargado de determinar la estructura de la subunidad menor del ribosoma de la especie *Thermus thermophilus*, una eubacteria utilizada ampliamente en la biotecnología (Calisto y Fita, 2009).

Finalmente en el año 2000, Yonath, Steitz y Ramakrishnan publicaron la estructura ya terminada de las dos subunidades del ribosoma procariota, donde la subunidad mayor perteneció a la especie *Haloarcula marismortui* y la menor a *Thermus thermophilus* (ver Figura 11). Por la determinación de la estructura atómica del ribosoma, Yonath, Steitz y Ramakrishnan recibieron el premio nobel de Química el año 2009.

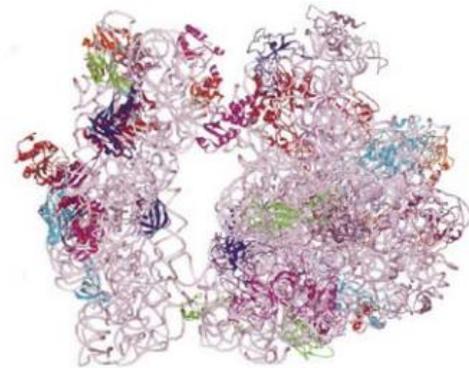


Figura 11. Estructura del ribosoma, al lado izquierdo la subunidad menor, y al lado derecho la subunidad mayor, 2000.

DIFRACCIÓN CON NEUTRONES

La difracción con neutrones es similar a la realizada con rayos X en el proceso. Sin embargo, a diferencia de ésta, los neutrones no interactúan con la nube electrónica de los átomos que componen al material, más bien el neutrón al encontrarse al interior del núcleo produce una dispersión a nivel de éste. El neutrón además, contiene momento magnético, esto lo convierte en una muy buena “sonda” para determinar las propiedades magnéticas que posee la materia. Una de las cosas que permite obtener mayor información en comparación a la difracción con rayos X, es que el neutrón es sensible a materiales con bajo número atómico, y distingue isótopos o elementos cercanos.

Hay distintas técnicas de dispersión de neutrones, pero la realizada con polvo es la más efectiva pues genera información muy relevante como; las dimensiones y la composición elemental de las celdas unitarias de las estructuras cristalinas, la simetría de redes cristalinas y genera una buena aproximación de las coordenadas fraccionales y los factores de ocupación de los átomos en la celda unitaria, entre otras. Para realizar la determinación estructural, se utilizan dos clases de difractómetros el DMC o difractómetro de alta densidad o el HRPT o difractómetro con alta resolución. En la Figura 12 se puede apreciar los difractómetros y parte de la determinación estructural de un compuesto.

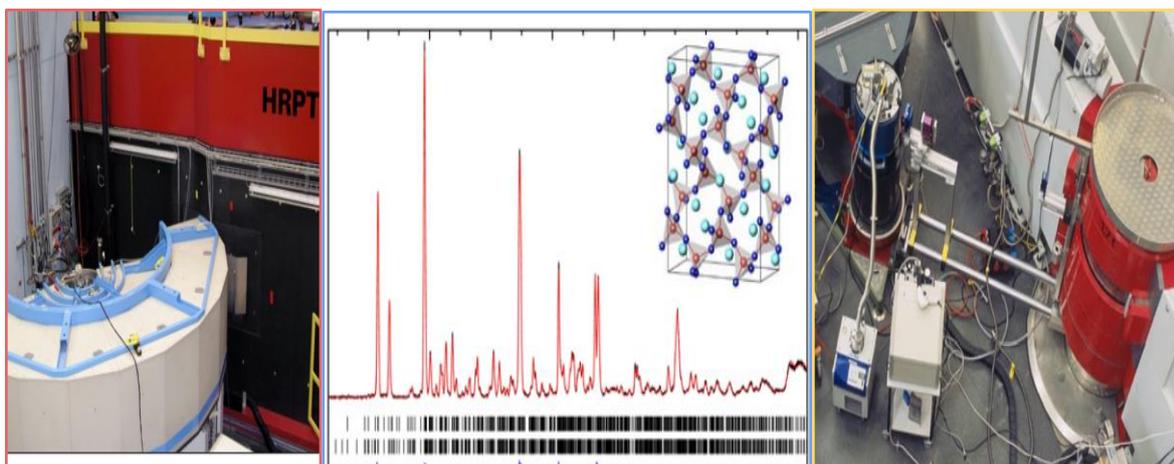


Figura 12. (Izquierda) Difractómetro de polvo, HRPT. (Centro) Determinación estructural de $RbFeO_2$ (Derecha) Difractómetro de polvo DMC.

CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA : UNA TÉCNICA SIN MONOCRISTALES

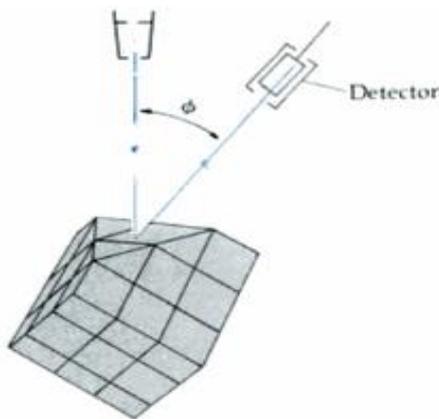
El nacimiento de la criomicroscopía electrónica, fue dado a partir de la complejidad de cristalizar muestras de interés Biológico, como por ejemplo son las proteínas. Además de su gran tamaño, son muy frágiles en su estructura por lo que cualquier cambio brusco podría provocar que esta se destruya. Por ello no necesita la cristalización, sin embargo requiere que la muestra esté congelada e implica el uso de la difracción de electrones. Además, los métodos de radiación sincrotrón son muy difíciles y costosos.

A continuación se explicará cómo esta técnica usada en el ámbito de la microscopia en especial de proteínas o compuestos orgánicos tiene su base en el descubrimiento de la difracción de electrones en 1927, para luego ser aplicada en la obtención de estructuras en especial de proteínas o sustancias orgánicas, de mejor resolución. Además para una mejor comprensión del contenido, se realizará una breve explicación de la microscopia electrónica con imágenes en 3D (premio nobel 1982), y luego se añadirá como se fue configurando la técnica que ganó un premio nobel el 2017.

Premio nobel 1937: Descubrimiento de la difracción de electrones

En esta época aún no se había comprobado la naturaleza ondulatoria del electrón; pero se sospechaba su existencia. En 1927 Clinton Davisson y Lester Germer, un par de físicos

estadounidenses, se encontraban realizando dispersión de electrones a partir de un blanco de níquel. Sin embargo, este se encontraba con una capa de óxido. Para eliminar esto decidieron calentar la muestra y por accidente el blanco de níquel cristalizó, pudiendo observar por primera vez la difracción de electrones. Además, notaron que en la dispersión la intensidad de los electrones, de acuerdo al ángulo de dispersión mostraba máximos y mínimos. Asombrados por el hallazgo decidieron repetir el experimento esta vez con un monocristal de níquel, al



cual impactaron con electrones, que luego se detectaban en una pantalla adyacente dependiendo del ángulo (Tipler, 2006) , como se observa en la Figura 13.

Figura 13. *Electrones procedentes de un cañón, impactan un cristal y se dispersan según un ángulo Φ (variable), llegando a un detector. Experimento Davisson-Germer.*

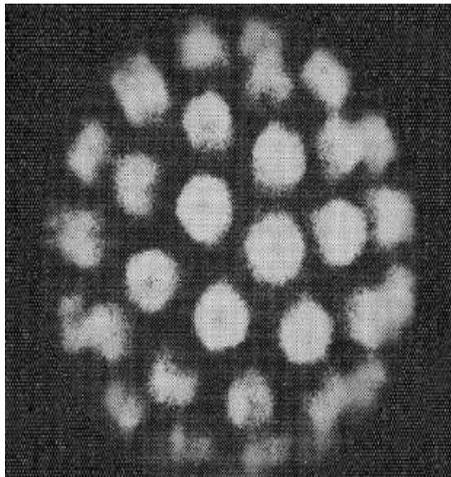
A los 50° , se obtuvo un máximo de dispersión electrónica. Éste ángulo lo relacionaron con la ecuación de Bragg , para la dispersión de ondas desde un cristal, con esto calcularon la longitud de onda, obteniendo para su sorpresa una concordancia con la ecuación de Broglie sobre la energía de los electrones. Realizaron varias pruebas más variando la energía de los electrones, resultando longitudes de onda distintas pero todas coincidían con la ecuación de Broglie (Tipler, 2006). Al mismo tiempo George Thompson, un físico británico observó a través de hojas metálicas finas, la difracción de electrones. Estas hojas metálicas se componen de pequeños cristales o cristalitas. Al hacer incidir rayos con un ángulo fijo (θ), el cristal lo dispersaría, y el haz se encontrara desviado al doble del del haz incidente (2θ), esto genera una imagen de difracción con círculos concéntricos (Tipler, 2006). Por este gran descubrimiento se le otorgó a Davisson y Thompson el premio nobel de Física en el año 1937.

Premio Nobel 1982 Microscopía electrónica

Los microscopios electrónicos utilizan electrones para interactuar con una sustancia y así obtener una imagen ampliada hasta dos millones de veces, unas mil veces más que un microscopio óptico. La desventaja que conlleva el uso de estos microscopios electrónicos es

que solo pueden dar una imagen 2D de los objetos, entonces no se podían ver en todas sus dimensiones MRC, 2018).

Aaron Klug, biofísico y físico británico -pero de origen lituano-, resolvió este inconveniente por medio de la microscopía electrónica de transmisión donde el haz de electrones traspasa la muestra. Klug tomó imágenes bidimensional de cristales en distintas direcciones y con ayuda de cálculos matemáticos y cálculos computacionales pudo producir la



estructura en 3D. También se podía realizar por medio de la difracción de electrones que generaban imágenes, usadas posteriormente para reconstruirlas en tres dimensiones. Con esto se pudieron estudiar de mejor forma virus, para después investigar la cromatina y como el ADN se encontraba dispuesto, y hacer desde ahí un modelo. Además se obtuvo la estructura en 3D del virus de la verruga humana (Figura 14).

Figura 14. Virus de la verruga humana.

Su aporte fue importante para construir las imágenes en 3D, pero además contribuyó junto a De Rosier con un problema que suscita esta microscopía y que se relaciona con el daño que genera el haz de electrones la muestra, además del bajo contraste en las imágenes obtenidas. Su solución fue aplicar un tipo de sales colorante de átomos pesados, de esta forma sobre ellos incidía la mayoría de la radiación y la proteína quedaba protegida; Además, se genera un imagen con alto contraste puesto que una proteína dispersa menos el haz que el colorante, lo que da un contraste al revés. De ahí el nombre tinción negativa (Nogales, 2016). Por su método de crear imágenes en tres dimensiones, como desarrollo de la microscopía electrónica se le otorgó a Klug el nobel de Química en 1982.

NACIMIENTO DE LA CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y PREMIO NOBEL 2017

Los microscopios de transmisión electrónica dan una señal a partir de un haz de electrones que se dispersa a causa de la interacción que tiene con la muestra, esta señal es recogida por un detector especial que da finalmente imágenes bidimensionales que pueden transformarse a 3D, como se vio anteriormente. En estos equipos, un haz de electrones es acelerado hasta alcanzar una velocidad cercana a la luz, que se corresponde a una longitud de onda de aproximadamente de 0,003 nm, unas 300 veces más pequeña que la longitud de onda de los rayos X(0,1 nm). Esto le confiere un mayor grado de resolución atómica (Florez y Guerra, 2018). Sin embargo, el microscopio electrónico tiene varias desventajas, primero las imágenes tienen poco contraste. Al respecto Klug, propuso una solución relacionada a la aplicación de tintes especiales como se mencionó anteriormente. Segundo, la muestra podría destruirse por la radiación y tercero, el agua muy necesaria para la mantención de estructura de la muestra se evapora debido a las condiciones de vacío. Además la muestra debe ser muy delgada y por último la muestra interactúa con los electrones, y es sensible a la temperatura (Mendoza y Padrón, 2018). Todos estos inconvenientes han sido resueltos a lo largo del tiempo como se verá a continuación.

En 1975 Richard Henderson, biólogo molecular y biofísico escocés, fue pionero en usar esta técnica con una muestra biológica en este caso de la bacteriorodopsina, que usando la cristalografía de rayos X hubiese sido imposible puesto que era muy difícil mantener a esta proteína pura, nativa y concentrada (Florez y Guerra, 2018) .Entonces para obtener la estructura, utilizó un cristal muy delgado y un haz de electrones de baja energía, para evitar destruir la proteína. Este proceso resultó exitoso; pero, para llevarlo a cabo se necesita trabajar en alto vacío, lo que genera problemas en las muestras biológicas, que necesitan agua para mantener su estado, afectando o destruyendo la muestra. Para poder resolver esto, propuso llevar la muestra a temperaturas muy bajas de forma rápida, transformado el agua líquida en hielo amorfo pues no tiene el tiempo suficiente de formar estructuras cristalinas. Además, la biomolécula puede mantener su estado nativo y podría también protegerse en parte de la radiación a la que es expuesta.

Joachim Frank, biofísico alemán, en 1975 se enfrentó al problema de tratar las imágenes bidimensionales con bajo contraste, en solución, no cristalizadas y dispuestas al azar (Mendoza y Padrón, 2018). Posteriormente en 1981, con la colaboración de Marin Van Heel un biofísico holandés, desarrollaron un método estadístico para determinar la estructura tridimensional de una proteína a partir de la bidimensional. Esto lo realizaron tomando la imagen obtenida de una partícula como un vector, luego asumieron que vectores similares serían partículas con orientaciones similares, y así se podrían promediar esas imágenes. Finalmente lograron idear un software que realizaba este análisis al que llamaron SPIDER (Gregersen, 2017). Lo importante de esta técnica de promedios, fue que se utilizaron las muestras no congeladas, permitiendo mantener por ejemplo al ribosoma, en su forma, y aun así obteniendo imágenes de alta calidad.

Jacques Dubochet, un biofísico suizo, junto a otros científicos lograron conservar un virus criogenizado con etano líquido a $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, y vieron cómo las partículas quedaban atrapadas en el agua vitrificadas o en este hielo amorfo, en distintas orientaciones, por lo tanto las interacciones con los electrones eran mínimas. Es a partir de 1981 que Dubochet junto a otros científicos desarrollaron un método que aún se usa, para criogenizar rejillas hechas de cobre (con esto el problema de la delgadez de la muestra se terminaba) , que contienen en su interior biomoléculas como proteínas (Mendoza y Padrón, 2018). Estas se sumergen en etano líquido a aproximadamente -196°C , consiguiendo así que la muestra tenga un estado congelado pero a la vez hidratado. Por sus aportes en el año 2017 se dió el premio nobel de Química por el desarrollo de la criomicroscopía electrónica a Jacques Dubochet, Richard Henderson y Joachim Frank.

Criomicroscopía electrónica: El proceso

El proceso comienza con la elección de una proteína. Para aislarla, se puede recurrir a la cromatografía por afinidad, por exclusión molecular o en gel de poliacrilamida, dependiendo entre otras cosas el tamaño de esta y su carga. Luego se purifica y se deposita en una lámina micro-perforada, que generalmente es de carbono o cobre, y que se encuentra sostenida por una estructura metálica. Esta rejilla se sumerge en etano líquido u otra sustancia criogénica, dejando a las partículas que componen la proteína atrapada en el hielo amorfo en distintas

orientaciones o direcciones. Posteriormente se lleva la muestra al criomicroscopio electrónico (Nogales, 2016), como se ilustra en la Figura 15 .

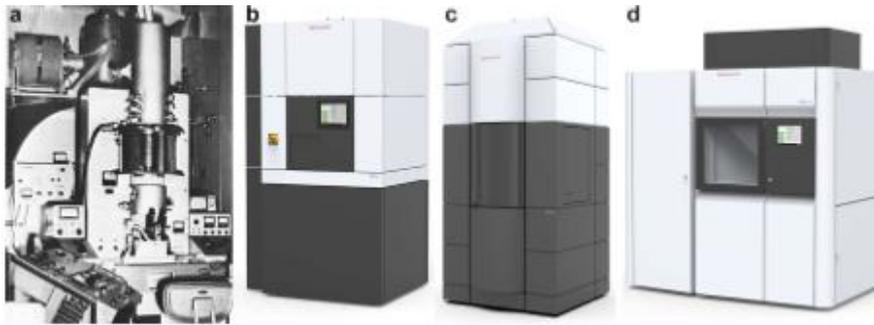


Figura 15 . Criomicroscopios, desde el más antiguo (a), hasta el más moderno (d).

Como se utiliza una baja intensidad del haz de electrones para no dañar la muestra, las imágenes suelen estar muy desordenadas, o “con mucho ruido “. Para corregir esto se realizan promedios a partir de muchas imágenes; sin embargo, como las muestras quedan dispersas en cualquier lugar de la rejilla es un proceso complicado. Por medio de procesamiento computacional se alinean y promedian los datos obtenidos usando por ejemplo los software SPIDER, IMAGIC, EMAN y RELION (Mendoza y Padrón, 2018). Se traza después un mapa 3D preliminar, para finalmente luego de algunos ajustes lograr la estructura 3D de la proteína. A continuación se muestra la Figura 16.a) y 16. b) que resume el proceso:

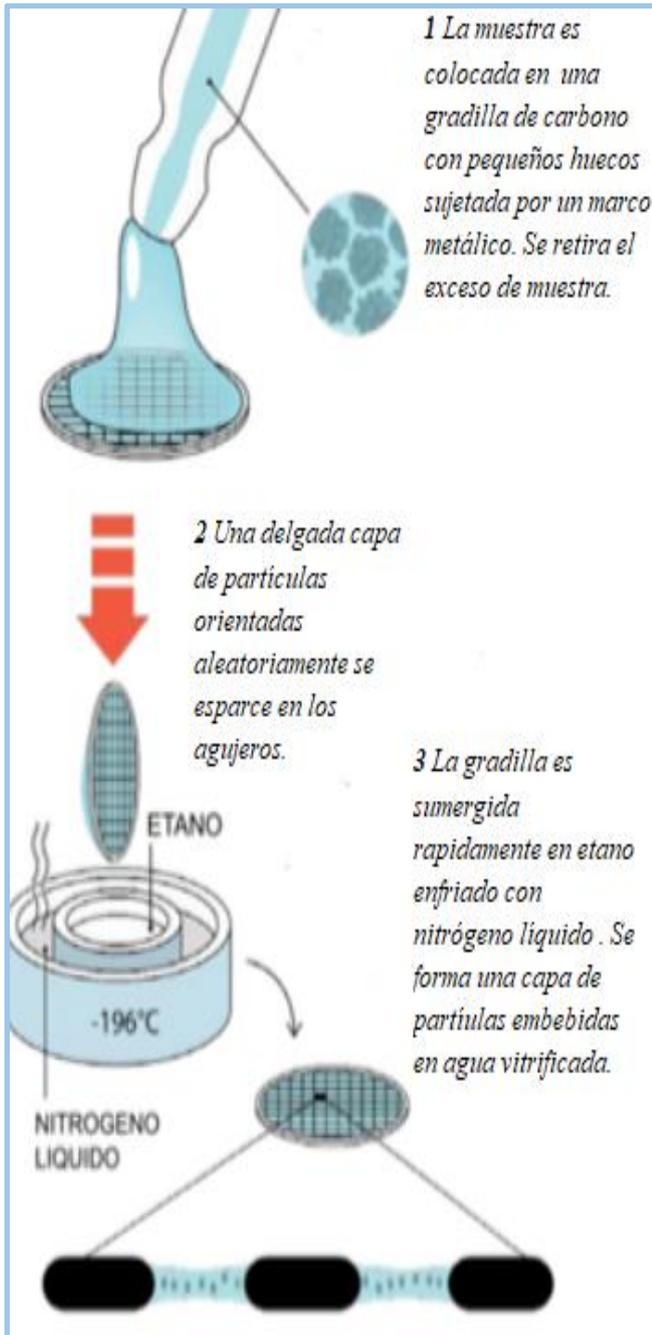


Figura 16.a) Preparación de la muestra.

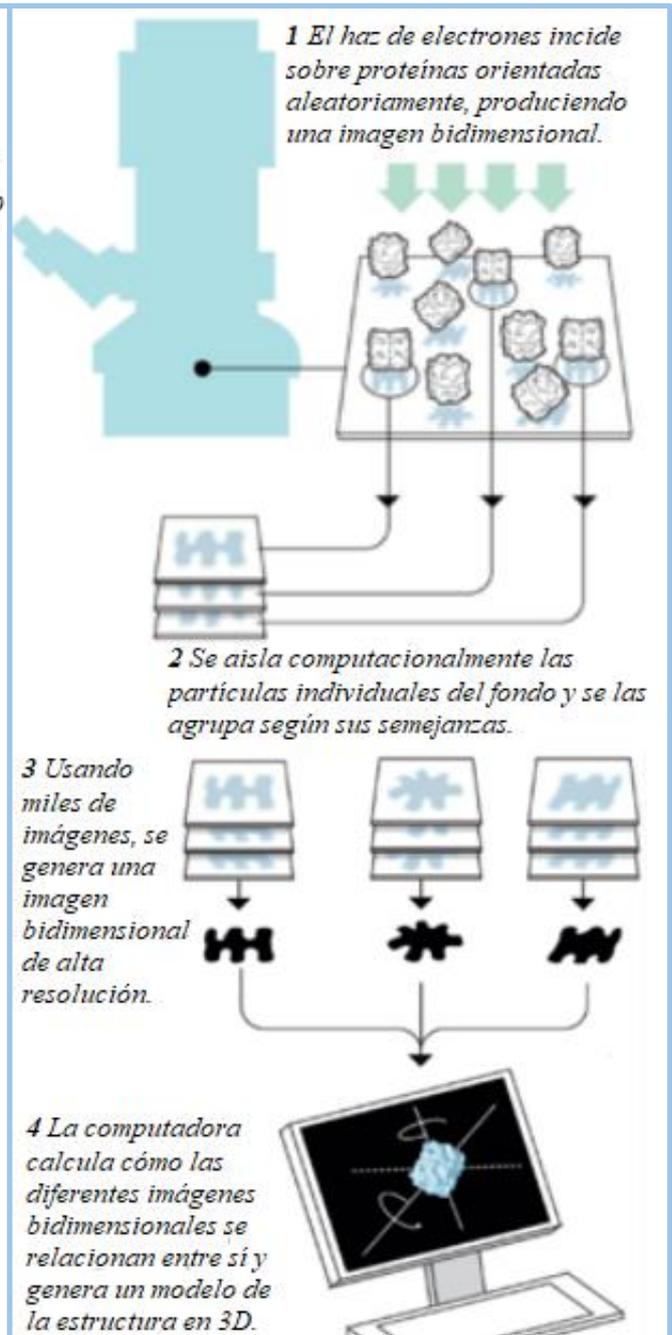


Figura 16.b) Criomicroscopía y determinación de estructura.

REFLEXIONES FINALES

Desde el descubrimiento de los rayos X, la cristalografía fue avanzando a pasos agigantados en un inicio. La difracción de rayos X era la única técnica disponible para resolver la estructura de una sustancia, y esta debía ser cristalizada primero. Las primeras fotografías de estructuras no eran tan claras ni precisas, pero con el tiempo la técnica fue mejorando. Además se incluyeron nuevas tecnologías y el uso de la computación facilitó mucho este proceso, pues ya no se resolvían las transformadas de Fourier “a mano”, esto además de disminuir el tiempo ayudaba a obtener mejores resultados.

Sin embargo, el uso de las proteínas significó un gran desafío para la cristalografía de rayos X pues, estas son muy delicadas y difíciles de cristalizar sin que pierdan su pureza, por ello comenzó a gestarse la criomicroscopía electrónica. Ésta técnica inició su camino con el descubrimiento de la difracción de electrones, y siguió con la creación del microscopio electrónico. Pero también tuvo complicaciones, por la fragilidad de la muestra que generalmente eran proteínas, pero además por las condiciones de vacío en que se tenía que realizar el proceso. A pesar de las dificultades, éstas fueron sorteadas por medio de agentes criogénicos en las muestras, de ahí surgió finalmente la criomicroscopía electrónica que hasta ahora es una de las técnicas más avanzadas y permite obtener imágenes de estructuras de moléculas biológicas a muy altas resoluciones.

En la actualidad, se necesita cada vez más la identificación de moléculas pequeñas y mediante la resonancia magnética nuclear (RMN), Espectroscopía infrarroja y técnicas clásicas de difracción, entre otras. Pese a esto, una nueva técnica ha generado un enorme impacto en la comunidad científica mundial. En octubre del presente año 2018 un artículo científico de una revista de alto índice de impacto se titula: “El método CryoEM: MicroED como una herramienta poderosa para la determinación de la estructura de moléculas pequeñas”, y que proporcionaría a partir de una muestra muy pequeña la estructura a una resolución atómica de menos de 1 Å en cuestión de minutos de moléculas orgánicas. Esto indica que el fenómeno de difracción y la cristalografía sigue su desarrollo incesante y nos entregará “grandes sorpresas” científicas en los próximos años.

REFERENCIAS

I. Contenido

Bernalte, A.(1997) El experimento de Friedrich, Knipping y Laue(1912).*Revista 100cias. Vo. 0, n°5115*. Recuperado desde :http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:revista100cias-1997-numero0-5115/Experimento_Friedrich.pdf

Calisto, B., Fita, I. (2009).Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada E. Yonath Premios Nobel de Química 2009: por sus estudios sobre la estructura y función del Ribosoma. *Anales de la Real Sociedad Española de Química. Vol. 104, n° 4*. Recuperado desde: <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/235594>

Consejo Superior de Investigaciones Científicas(CSIC). (2018). Dispersión y difracción. El factor de estructura. Madrid, España: Cristalografía. Recuperado desde: http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_05_7.html

Consejo Superior de Investigaciones Científicas(CSIC). (2018). Resolución estructural.. Madrid, España: Cristalografía. Recuperado desde: http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_05_7.html

Diamond Ligth. (2018). Cristalografía Macromolecular (MX). Oxfordshire, Reino Unido: Diamond Light Source. Recuperado desde : <https://www.diamond.ac.uk/Science/Research/Techniques/Diffraction/MX.html>

Diaz, O., Fuentes, A., Romero, F. y Ruíz, J. (2017). Estructura y aplicaciones de un sincrotrón. *Revista Inventio. Vol. 13, n° 29*. Recuperado desde : <http://inventio.uaem.mx/index.php/inventio/article/view/158/818>

Donkova, T., Sánchez, E. (2010).El ribosoma lo que nos ha enseñado su estructura. *Revista educación química. Vol. 21, n° 1*. Recuperado desde: <http://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v21n1/v21n1a14.pdf>

Florez, A., Guerra, D. (2018).Crío-microscopía electrónica. Resolviendo la estructura molecular de la vida al detalle atómico. *Revista Acta Herediana vol. 61, N° 1*. Recuperado desde:<http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/AH/article/download/3300/3338>

García, D., García, C. (2005). ANNA BERTHA ROENTGEN (1833-1919): LA MUJER DETRÁS DEL HOMBRE. *Revista chilena de radiología. Vol. 11, n° 4*. Recuperado desde : <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-93082005000400006>

Garman, E. (2014). La evolución de cristalografía de rayos X , determinación de estructura de macromoléculas biológicas. *Revista Science. Vol. 343. n°6175*. Recuperado desde: <http://science.sciencemag.org/content/343/6175/1102.full>

Gregersen, E. (2017, 16 de octubre).Joachim Frank. Enciclopedia británica. Recuperado desde: <https://www.britannica.com/biography/Joachim-Frank#accordion-article-history>

Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM. (2015). 2014 Año de la cristalografía. Recuperado desde: <http://www.iim.unam.mx/revista/pdf/numero23.pdf>

IUCR, página web de la International Union of Crystallography. <https://www.iucr.org/iucr>: .página web visitas en octubre del 2018.

Axford, D., Evans, G. y Owen,R. (2011). El diseño de los experimentos de difracción de cristalografía macromolecular. *Revista IUCrJ . Vol. 67. n° 4*. Recuperad desde: <http://journals.iucr.org/d/issues/2011/04/00/ba5168/index.html>

Jones, C., Martynowycz, M., Hattne, J., Fulton, T., Stoltz,B., Rodríguez,J., Nelson, H., y Gonen,T.(2018). El método CryoEM MicroED como una herramienta poderosa para la determinación de la estructura de moléculas pequeñas. *ACS central science* (2018, 17 de octubre). Recuperado desde: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.8b00760>

Mendoza, F.,Padrón, R. (2018). La Revolución de la Resolución: la Criomicroscopía Electrónica de partículas aisladas resuelve la estructura atómica de biomoléculas en solución.

Revista avances en química. Vol, 13, n° 1. Recuperado desde: www.saber.ula.ve/avancesenquimica

MRC Laboratorio de Biología Molecular. (2018). Premio de Química 1982 - Aaron Klug. Cambridge, Reino Unido : Medical Research Council. Recuperado desde: <https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/achievements/lmb-nobel-prizes/1982-aaron-klug/>

Muñoz, A., Garriz, A. (2013). Mujeres y química. Parte IV. Siglos XX y XXI. *Revista educación química. Vol. 24, n°3.* Recuperado desde: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2013000300009

Nogales, E. (2016). Breve historia de la criomicroscopía electrónica. *Revista Investigación y ciencia. Mayo 2016, n°476.* Recuperado desde: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/antepasado-misterioso-670/breve-historia-de-la-criomicroscopa-electrnica-14156>

Perles, J. (2015). DEL CRISTAL AL ÁTOMO: UN SIGLO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X. *Revista Ciencia y Técnica entre la Paz y la Guerra. 1714, 1814, 1914.* Recuperado desde: <https://www.researchgate.net/publication/309723401>

Pickworth, J. , Trueblood, K. (2010). *Crystal structure analysis, Ed. 3ª.* Los ángeles, EE.UU: Oxford Science Publications.

Rabinovich, D. (2014). De tal palo, tal astilla. *Revista de Química PUCP, Vol. 28, n° 1-2.* Recuperado desde: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/viewFile/10824/11325>

Rodríguez, A. (2018). ¿Qué es y para qué es útil la cristalografía de proteínas?. [diapositivas de PowerPoint]. Recuperado de : <https://www.acs.org/content/dam/acsorg/events/spanish-webinars/slides/2018-06-13-sqm-cristalografia-diapositivas.pdf>

Sands, D., (1993). *Introducción a la cristalografía.* Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.

Sheptyakov, D., Keller,L. (2010). Difracción de neutrones en polvo. Villingen, Suiza.: Instituto Paul Scherrer. Recuperado desde: <https://www.psi.ch/industry/DienstleistungenTabelle/NUM-F08-D-10.pdf>

Tipler, P., (2006). *Física preuniversitaria. Volumen II.* Barcelona, España:Editorial Reverté, S.A.

Unesco, IUCr. (2014).Crystallography matters!.Recuperado desde: http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/pdf/sc_crystallography_Matters_EN.pdf

Ulloa,L. (1995).Roentgen y el descubrimiento de los rayos x. *Revista de la facultad de medicina de Colombia. Vol. 43, n° 3.* recuperado desde: <http://bdigital.unal.edu.co/22596/1/19228-63070-1-PB.pdf>

Varios.(abril de 1896). Los rayos de Roentgen en américa.*McClure's Magazine. Vol. 6, No. 5,* p 414.

Whelan, J., Koussa,J., Chehade,I.,Sabanovic,M.,Chang, A., Carelli,D., Un, Z., Zhang, L.,Bernstein,J., y Rabeh,W. (2018).Crystal growth, a research-driven laboratory course. *Journal of applied crystallography. Vol. 51 n°5.* Recuperado desde : <http://journals.iucr.org/j/issues/2018/05/00/gj5204/index.html>

II. Figuras

Sociedad Internacional para la Historia de la Radiología(s,f).Bienvenido a la Sociedad Internacional para la Historia de la Radiología - ISHRAD. [Figura 1]. Recuperado desde <http://ishrad.org/>

Ulloa,L. (1995).Roentgen y el descubrimiento de los rayos x. [Figura 2]. Recuperado desde <http://bdigital.unal.edu.co/22596/1/19228-63070-1-PB.pdf>

Physicsopenlab.(2018).Difracción Laue. [Figura 3]Recuperado desde <http://physicsopenlab.org/2018/01/18/diffrazione-laue/>

Perles, J. (2015). DEL CRISTAL AL ÁTOMO: UN SIGLO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.[Figura 4] . Recuperado desde: <https://www.researchgate.net/publication/309723401>

Rabinovich, D. (2014).De tal palo, tal astilla.[Figuras 5]. Recuperado desde: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/viewFile/10824/11325>

Galdámez, A. (2018). Comunicación personal.[Figura 6] . Departamento de ciencias, Universidad de Chile.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas(CSIC). (2018). Dispersión y difracción. El factor de estructura.[Figura 7]. Recuperado desde: http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_05_7.html

Garman, E. (2014). La evolución de cristalografía de rayos X , determinación de estructura de macromoléculas biológicas.[Figura 8]. Recuperado desde: <http://science.sciencemag.org/content/343/6175/1102.full>

Martin, A. (2016).Dorothy Crowfoot, la bioquímica que desentrañó la estructura de la insulina.[Figura 9] Recuperado desde: <https://omicronno.elespanol.com/2016/05/dorothy-crowfoot-hodgkin-biografia/>

Donkova, T., Sánchez, E. (2010).El ribosoma lo que nos ha enseñado su estructura.[Figura 10]. Recuperado desde: <http://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v21n1/v21n1a14.pdf>

Calisto, B., Fita, I. (2009).Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz y Ada E. Yonath Premios Nobel de Química 2009:"por sus estudios sobre la estructura y función del Ribosoma. [Figura 11]. Recuperado desde: <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/235594>

Sheptyakov, D., Keller,L. (2010). Difracción de neutrones en polvo.[Figura 12]. Recuperado desde: <https://www.psi.ch/industry/DienstleistungenTabelle/NUM-F08-D-10.pdf>

Tipler, P., (2006). Física preuniversitaria. Volumen II.[Figura 13]. Página 894.

MRC Laboratorio de Biología Molecular. (2018). Premio de Química 1982 - Aaron Klug.[Figura 14]. Recuperado desde: <https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/achievements/lmb-nobel-prizes/1982-aaron-klug/>

Mendoza1, F.,Padrón, R. (2018). La Revolución de la Resolución: la Criomicroscopía Electrónica de partículas aisladas resuelve la estructura atómica de biomoléculas en solución.[Figura 15] Recuperado desde: www.saber.ula.ve/avancesenquimica

Florez, A., Guerra, D. (2018).Crío-microscopía electrónica. Resolviendo la estructura molecular de la vida al detalle atómico. [Figuras 16.a y 16.b] Recuperado desde: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/AH/article/download/3300/3338>