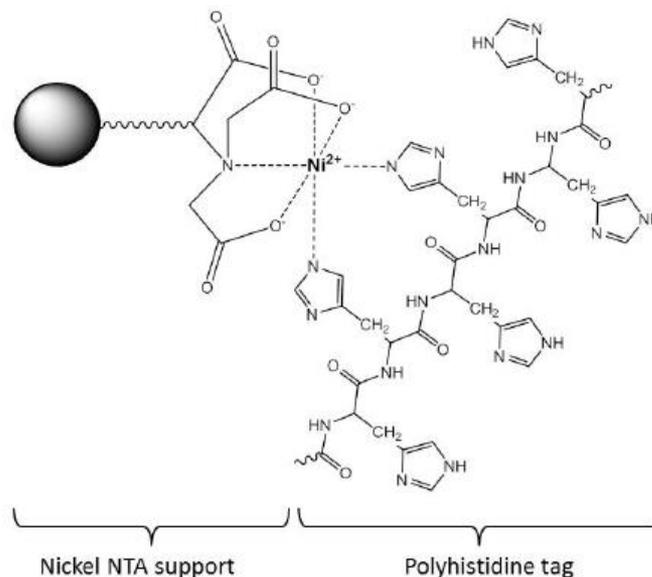


Uma técnica moderna de purificação de proteínas emprega o uso de compostos de coordenação envolvendo os metais de transição. Nesta técnica, proteínas que contêm um polipeptídeo terminal com 6 aminoácidos histidina em sequência (“Polyhistidine tag” indicado na figura abaixo) são adsorvidas em uma coluna cromatográfica que contém íon Ni^{2+} complexado com um suporte insolúvel em água (“Nickel NTA support” indicado na figura abaixo). Como a formação do complexo depende da presença da polihistidina, é possível reter esta proteína deixando outras passar. Posteriormente é possível dessorver a proteína complexada, liberando-a na forma pura. Com base no exposto e nos seus conhecimentos sobre química bio-inorgânica responda:

a) (1,0 ponto) Porque o íon Ni^{2+} forma um complexo octaédrico e não tetraédrico? Considere que todos os quelantes são de campo forte. Mostre cálculos de estabilização para justificar sua resposta.

b) (1,0 ponto) Considerando que o pK_a das histidinas envolvidas é 5,5, proponha uma forma de “soltar” a proteína adsorvida no suporte. Mostre equilíbrios para justificar sua resposta.

c) (1,0 ponto) Considerando que o pK_a dos três ácidos carboxílicos pertencentes ao suporte (“Nickel NTA support”) é igual a 4,0, o que poderia ser previsto se o procedimento de purificação fosse seguido de uma lavagem do suporte com solução em $\text{pH } 2,5$? Mostre equilíbrios para justificar sua resposta.

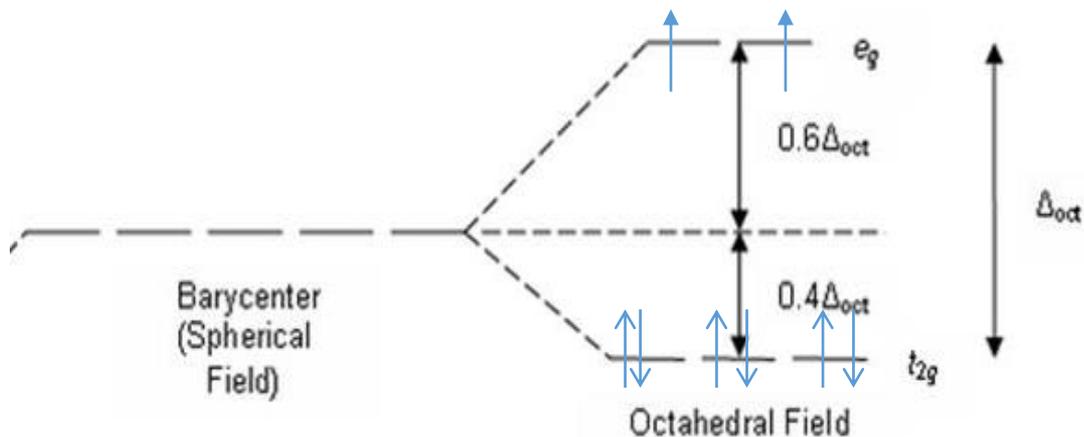


RESOLUÇÃO NOS PRÓXIMOS SLIDES

a) (1,0 ponto) Porque o íon Ni^{2+} forma um complexo octaédrico e não tetraédrico? Considere que todos os quelantes são de campo forte. Mostre cálculos de estabilização para justificar sua resposta.

Íons Ni^{2+} têm configuração de elétrons $3d^8 4s^0$

COM LIGANTES DE CAMPO FORTE, em estruturas octaédricas, teremos:



8 elétrons "d" em estrutura octaédrica:

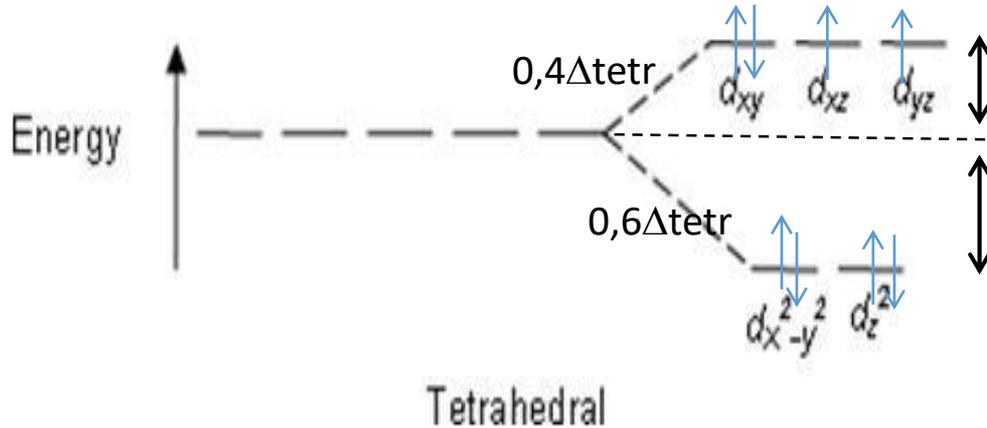
$6 \times 0,4 \Delta_{\text{octaédrico}}$ (estabilizante) = $2,4 \Delta_{\text{octaédrico}}$

$2 \times 0,6 \Delta_{\text{octaédrico}}$ (destabilizante) = $1,2 \Delta_{\text{octaédrico}}$

Estabilização = $1,2 \Delta_{\text{octaédrico}}$ - 3x energias para emparelhamento de elétrons (note que estamos assumindo ligantes de campo forte e, por isso, degeneração intensa de energia entre os orbitais d. Ou seja, os valores de ΔE são grandes e a energia demandada pelo emparelhamento de elétrons seria desprezível)

>> e se fosse hipoteticamente tetraédrico com ligantes de campo forte.....

8 elétrons "d" em uma estrutura tetraédrica com ligantes de campo forte daria:



$$4 \times 0,6 \Delta_{\text{tetraédrico}} \text{ (estabilizante)} = 2,4 \Delta_{\text{tetraédrico}}$$

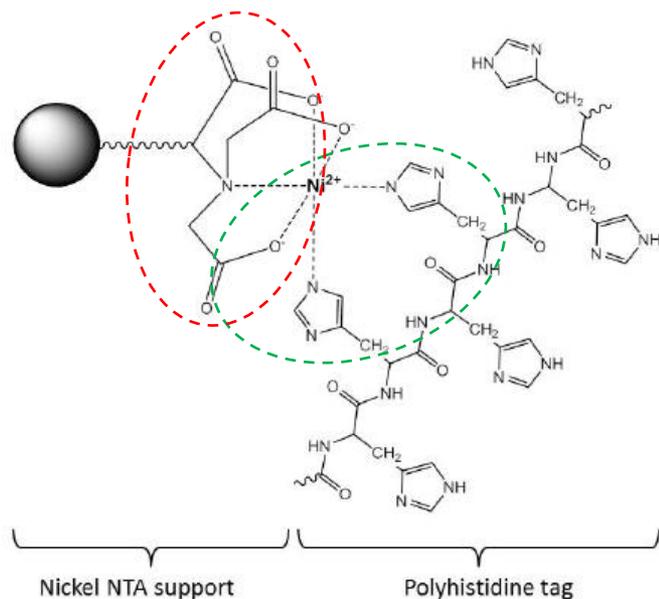
$$4 \times 0,4 \Delta_{\text{tetraédrico}} \text{ (destabilizante)} = 1,6 \Delta_{\text{tetraédrico}}$$

$$\text{Estabilização resultante} = 0,8 \Delta_{\text{tetraédrico}} - 2 \times \text{energia para emparelhamento de elétrons}$$

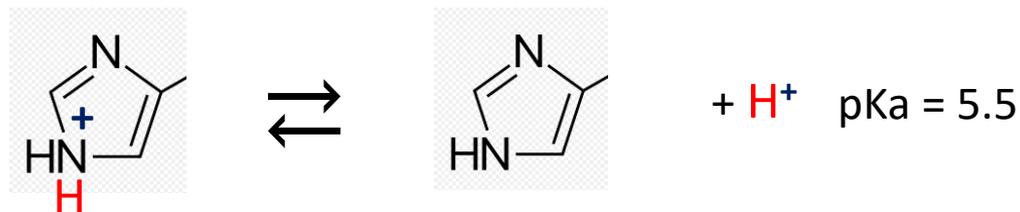
Note ainda que o $\Delta_{\text{tetraédrico}}$ é MENOR do que o $\Delta_{\text{octaédrico}}$, sendo aproximadamente metade do valor do $\Delta_{\text{octaédrico}}$

Portanto, o íon Ni^{2+} , na presença de ligantes de campo forte, é significativamente mais estabilizado em estruturas octaédricas com 6 ligantes do que em estruturas tetraédricas com 4 ligantes

b) (1,0 ponto) Considerando que o pKa das histidinas envolvidas é 5,5, proponha uma forma de “soltar” a proteína adsorvida no suporte. Mostre equilíbrios para justificar sua resposta.



Para atuar como quelantes do Ni^{2+} , as histidinas das proteínas adsorvidas no suporte necessitam estar na forma desprotonada. Portanto, considerando o equilíbrio ácido-base:



Bastaria acidificar o meio até pHs menores do que 5,5, situação onde predominariam as histidinas protonadas, o que geraria repulsão entre as cargas positivas do Ni^{2+} e das histidinas com carga positiva, liberando, portanto, a proteína adsorvida.

c) (1,0 ponto) Considerando que o pKa dos três ácidos carboxílicos pertencentes ao suporte (“Nickel NTA support”) é igual a 4,0, o que poderia ser previsto se o procedimento de purificação fosse seguido de uma lavagem do suporte com solução em pH 2,5? Mostre equilíbrios para justificar sua resposta.

Neste caso, o equilíbrio envolvido seria: $-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$ pKa = 4,0

Em pH 2,5, predominaria a forma protonada dos ácido carboxílicos, sendo que estes deixariam de ser bons quelantes do íon Ni^{2+} , o que ocasionaria a perda de Ni^{2+} no suporte.

Integrando as informações dos itens b e c, notamos que a dessorção da proteína deve ocorrer em pHs menores do que 5,5, mas maiores do que 4,0.