



Dissertação de Mestrado

**A INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO MICRORGANISMO NA  
FOTOCINESIA DO PROCARIOTO MULTICELULAR  
MAGNETOTÁTICO “*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*”**

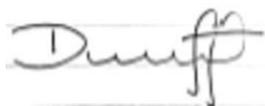
Marcos Venício Gonçalves Sales  
2020

---

A INFLUÊNCIA DO TAMANHO DO MICROORGANISMO NA  
FOTOCINESIA DO PROCARIOTO MULTICELULAR  
MAGNETOTÁTICO “*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*”

**MARCOS VENÍCIO GONÇALVES SALES**

Dissertação de Mestrado em Física, apresentada  
no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas do  
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e  
Comunicações. Fazendo parte da banca  
examinadora os seguintes professores:



Daniel Acosta Avalos - Presidente/Orientador/CBPF



Fernanda de Ávila Abreu – IMPG/UFRJ



André Linhares Rossi - CBPF

Rio de Janeiro, 22 de setembro de 2020.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais e meus irmãos: abaixo de Deus, são vocês.

À minha companheira Denize Gonçalves Barros, pelo carinho, amor e sustentação nos momentos mais difíceis. Quando a gira girou, você não me abandonou.

À Maria Rosa, que ressignificou a vida.

## AGRADECIMENTOS

Foram aproximadamente três anos e meio trabalhando e morando em Belém do Pará, cumprindo as demandas do mestrado no Rio de Janeiro, e tentando equilibrar essa rotina com a saudade dos familiares e amigos na Bahia. O valor gasto com passagens aéreas eu preferi não contabilizar. Foram noites perdidas, sapos engolidos, crises de ansiedade contornadas...

Em um percurso tão complexo e fora do comum para a conclusão desta dissertação, e consequente obtenção do título de Mestre em Física, tenho muito a quem agradecer. Agradecer a pessoas que tiveram influência direta e indireta neste processo. Todavia, para que o texto não fique tão maior que o convencional (mas ainda insuficiente), vou me limitar a uma lista não exaustiva de nomes que não poderiam deixar de constar.

Além dos citados na dedicatória:

À minha tia, amiga e anfitriã no Rio de Janeiro, Maria José, que sempre me motivou e inspirou a seguir meus objetivos com responsabilidade sentimental.

À memória de Matilde Alves Sales (Voinha), com quem sempre quis dividir esse momento. Mulher de história inspiradora, que sempre teve orgulho de seus filhos e netos.

À nova extensão do meu núcleo familiar: Dona Nazaré, Danilo, Daniele, Rosana e Elton, pessoas que me acolheram com muito carinho.

Aos amigos e colegas do IFUFBA, Vinicius, Heber, Hebert, destaque para os colegas do curso noturno da Licenciatura em Física, cuja união deu fôlego para concluir a graduação, assim como alguns colegas do CBPF.

À minha eterna amiga Carol Marques, apoio essencial no início deste processo, e a quem sempre guardarei profundo carinho e admiração.

Aos amigos Kim Veiga, Rodrigo Barros e Jamille Assis, que desenharam o caminho das pedras nessa travessia desafiadora.

À amiga Manu Souza, que me ajudou nas revisões com o inglês.

Aos amigos e amigas de longa data pelo apoio, cada um em seu momento: Beto, Caio, West, Naranda, César, Milena, Anjuli, Oksana, Vanessa, Victor, Thiago, Vero, Diana, Ramon, Rafael, minha prima Tiane....essa lista não fecha facilmente.

Ao meu primo Willames Santos, cuja minha admiração, parceria e confiança são inabaláveis.

Ao casal Reinaldo e Deísa, pela hospitalidade no Rio de Janeiro.

Aos professores José Helayël e Arthur Moraes do CBPF, e José Garcia e Alberto Brum da UFBA, pelo costumeiro e indispensável apoio.

Ao professor Daniel Acosta-Avalos por aceitar seu meu orientador apesar das dificuldades prováveis ao longo deste percurso.

Ao professor Henrique Lins de Barros, por ceder seu espaço de forma tão amigável.

Ao DPF Rios pela ajuda, compreensão e fonte de exemplo enquanto chefe.

À Rita Meyer, do DAAD-Rio, por dispor do seu tempo para me estimular.

Ao eterno mestre Traíra (in memorian), que me ensinou muito mais que capoeira.

A Victor Pablo, Priscila Filgueiras, Laura Amaral, Otânia Freire e Bruno Brabo, por me ajudarem nos cuidados com saúde mental.

À memória de João Cândido Felisberto, líder da Revolta da Chibata, Mestre dos Mares, Almirante Negro, que me fez compreender que a importância de mais um negro obter o título de Mestre se sobrepõe a quaisquer questões individuais.

A quem não pude mencionar, minha memória nunca foi das melhores...

A Deus, aos Orixás, e demais entidades divinas que reproduzem o amor e paz.

“Naquela noite o clarim não pediria silêncio e sim  
combate”

*(João Cândido Felisberto)*

## RESUMO

Microrganismos com propriedades de magnetossensibilidade, tal como as bactérias magnetotáticas, são estudados desde a década de 1970. Durante estas pesquisas, foram identificados procariotos multicelulares com a referida propriedade. Neste trabalho, o procarioto multicelular magnetotático '*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*' (*Ca. M. multicellularis*) foi estudado com o objetivo de identificar a influência do comprimento de onda da luz e da fisiologia do microrganismo no mecanismo de magnetossensibilidade, em especial no que diz respeito ao mecanismo de pares radicais – RPM, utilizando a técnica da “Volta em U”. Foram realizados três experimentos ao longo de aproximadamente um ano (10/2017 a 10/2018). Verificou-se que, no primeiro experimento, o comprimento de onda da luz modificou o resultado para a velocidade média e o tempo da volta em U dos organismos, neste último, porém, o campo magnético radiofrequência não demonstrou influência nos resultados. Para os dois seguintes experimentos realizados, a média de tamanhos dos organismos coletados aumentou significativamente e esse fator influenciou diretamente nos resultados obtidos, reduzindo ou eliminando as diferenças. O aumento de tamanho pode estar relacionado com o processo de divisão do microrganismo e, ao que parece, este processo afeta as propriedades magnetossensíveis do *Ca. M. multicellularis*. Já o aumento da velocidade com o aumento da intensidade do campo magnético aplicado (de 0,2mT para 2,0mT) se manteve em todos os experimentos, o que traz à tona outras questões relevantes sobre o *Ca. M. multicellularis*.

**Palavras-chave:** *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*. Magnetotaxia. Bactéria magnetotática. Fotocinesia.

## ABSTRACT

Microorganisms with magnetosensitive properties, such as magnetotactic bacteria, have been studied since the 1970's. During these research, multicellular prokaryotes were identified with that property. In this work, the multicellular magnetotactic prokaryote "*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*" (*Ca. M. multicellularis*) was studied in order to identify the influence of the light wavelength and the physiology of microorganism on its magnetosensitivity, especially with regard to the radical pair mechanism – RPM, using the "U-turn" technique. Three experiments were carried out over approximately one year (10/2017 to 10/2018). It was found that, in the first experiment, the light wavelength modified the result for the average speed and U-turn time of the microorganisms, even though, in the latter parameter, the magnet field at radiofrequency does not show influence on results. However, for the following two experiments, the average size of the collected microorganisms increased significantly, and this factor directly influenced the results obtained, reducing, or eliminating the differences. The increase of size may be related to the process of division of the microorganism and, apparently, this process affects the magnetosensitive properties of *Ca. M. multicellularis*. The increase in speed with the increase in the intensity of the applied field (from 0.2mT to 2.0mT) was maintained in all experiments, which brings up others relevant issues about the *Ca. M. multicellularis*.

**Keywords:** *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*. Magnetotaxis. Magnetotactic bacteria. Photokinesis.

## Sumário

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 BACTÉRIA MAGNETOTÁTICA</b> .....	1
<b>1.2 O MAGNETOSSOMO</b> .....	3
<b>1.3 CANDIDATUS MAGNETOGLOBUS MULTICELLULARIS</b> .....	4
<b>1.3.1 Configuração Magnética do <i>Ca. M. multicellularis</i></b> .....	8
<b>1.4 O USO DAS VOLTAS EM U (U-TURN) NO ESTUDO DO <i>Ca. M. multicellularis</i></b> .....	10
<b>1.5 EFEITOS DE LUZ EM <i>Ca. M. multicellularis</i> E O MECANISMO DE PARES RADICAIS</b> .....	13
<b>1.6 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>CAPÍTULO 2: METODOLOGIA</b> .....	18
<b>2.1 COLETA E MANUTENÇÃO DO <i>Ca. M. multicellularis</i></b> .....	18
<b>2.2 ISOLAMENTO</b> .....	18
<b>2.3 MICROSCÓPIO ÓTICO INVERTIDO E O SISTEMA DE OBSERVAÇÃO</b> .	19
<b>2.4 LUZ MONOCROMÁTICA DO MICROSCÓPIO</b> .....	22
<b>2.5 GRAVAÇÃO DOS VÍDEOS COM LUZ MONOCROMÁTICA</b> .....	22
<b>2.6 ANÁLISE DAS VOLTAS EM U</b> .....	23
<b>2.7 ANÁLISE DOS DADOS</b> .....	25
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS</b> .....	27
<b>3.1 VELOCIDADE NOS TRÊS COMPRIMENTOS DE ONDA COM ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	27
<b>3.1.1 Experimento I</b> .....	27
<b>3.1.2 Experimento II</b> .....	28
<b>3.1.3 Experimento III</b> .....	28
<b>3.2 ENERGIA CINÉTICA NOS TRÊS COMPRIMENTOS DE ONDA COM ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	29
<b>3.2.1 Experimento I</b> .....	29
<b>3.2.2 Experimento II</b> .....	30
<b>3.2.3 Experimento III</b> .....	31
<b>3.3 TEMPO DA VOLTA EM U E MOMENTO MAGNÉTICO</b> .....	32
<b>3.3.1 Experimento I</b> .....	32
<b>3.3.2 Experimento II</b> .....	33
<b>3.3.3 Experimento III</b> .....	34
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	36
<b>4.1 VELOCIDADE E ENERGIA CINÉTICA</b> .....	36

<b>4.2 TEMPO DA VOLTA EM U E MOMENTO MAGNÉTICO .....</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>48</b>

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

As próximas páginas tratam de uma propriedade descoberta em uma das formas de vida terrestre mais primitiva: a interação de procariontes com o campo geomagnético. Neste trabalho, o foco será na “magnetorrecepção” do procarionte multicelular *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*.

Em mais detalhes, as primeiras suspeitas de interação de seres vivos com o campo magnético aconteceram nos trabalhos de Salvatore Bellini em 1963 (que só veio a ser amplamente conhecido em 2009) e Richard Blakemore em 1975 [1], [2]. O primeiro percebeu que um tipo não definido de bactéria sempre se concentrava em um lado da amostra (numa direção geográfica preferencial), lado este que coincidia com o norte geomagnético, sugerindo que haveria um compasso biomagnético no interior desses micro-organismos. Blakemore também trabalhou com bactérias, quando observou por acaso um fenômeno similar ao descrito por Bellini, dando o nome de magnetotaxia (*magnetotaxis*) a essa propriedade.

Estudar o comportamento, composição, anatomia, fisiologia, entre outros fatores dessas espécies, é de utilidade e importância imensurável. Além de ajudar na compreensão sobre a interação de seres vivos com o campo magnético da Terra (ou de outras fontes), podem servir como bioindicadores para estudos de ecossistemas diferenciados, arqueologia, inclusive em buscas por vestígios de vida em outros planetas[3].

### 1.1 BACTÉRIA MAGNETOTÁTICA

Em termos taxonômicos, Bacteria é um domínio de organismos procariontes, isto é, células que carecem de membranas envolvendo núcleo e outras organelas, com dimensões de alguns micrômetros (~0,2 a 30  $\mu\text{m}$ ). Estão entre as primeiras formas de vida da Terra e são encontradas nos mais diversos ambientes e ecossistemas, ainda que inóspitos a muitas outras formas de vida.

Esses micro-organismos podem se apresentar em formatos específicos como: cocos (aproximadamente esférica), bacilo (bastonete), vibrião (forma de vírgula), espirilo (espiral) e espiroqueta (forma acentuada de espiral). Em sua estrutura, possuem: nucleóide com RNA, ribossomos, citoplasma, membrana plasmática. Todas contam com uma parede celular que é

praticamente composta por *peptideoglicanos*. Geralmente as células procarióticas não possuem organelas internas envoltas por membrana. As bactérias também podem conter flagelos para realizar sua propulsão. Esses flagelos podem ser peritríquios (quando distribuídos ao longo da cápsula celular) ou polares (em uma ou ambas as extremidades da célula). Os flagelos polares podem ainda ser classificados como monotríquios ou lofotríquios, no caso de um flagelo ou um tufo de flagelos em um pólo da célula, respectivamente; ou anfitríquios, quando há flagelos em ambos os pólos da célula. Em 1884, o médico dinamarquês Hans Christian Joachin Gram (1853-1938) desenvolveu um método de coloração das bactérias que resultou em uma nova forma de classificação: a coloração de Gram, na qual as bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas. A principal diferença entre as duas está na parede celular: no caso da Gram-positiva, é constituída por muitas camadas de peptideoglicanos, formando uma estrutura rígida e espessa; enquanto nas Gram-negativas há somente uma fina camada de peptideoglicano, mas ainda conta com uma membrana externa formada por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos. Entre as Gram-positivas e Gram-negativas, a parede celular desta última está mais suscetível ao rompimento mecânico [4].

As bactérias podem receber classificações quanto a diversas propriedades: fonte de energia, metabolismo, tipo de membrana etc.; no caso deste trabalho, a classificação que mais interessa é quanto a taxia. Esse último aspecto diz respeito ao estímulo que orienta o movimento das bactérias, entre eles há quimiotaxia (quando é orientada pela concentração de alguma substância presente no ambiente), a fototaxia (estímulo proveniente da luz) e a mecanotaxia (movimento orientado pelos gradientes de rigidez do fluido, tensões de cisalhamento etc.). Nas bactérias magnetotáticas, o movimento é orientado sob a influência do campo magnético terrestre graças a cristais de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) no interior da célula, que funcionam como verdadeiras bússolas. Entre os tipos mais estudados e citados de bactérias desta classificação estão as *Magnetospirillum magnetotacticum* [5], *Magnetospirillum gryphiswaldense* [6], *Magnetococcus marinus* [7], dentre outras.

Como o campo geomagnético tem inclinação em relação à superfície (possui componente vertical), acredita-se que as bactérias magnetotáticas utilizam essa informação para o seu deslocamento vertical; somando-se à influência do gradiente de oxigênio, comum em ambientes aquáticos, tendem a nadar no sentido para baixo, demonstrando uma quimiotaxia (ou aerotaxia, neste caso em particular)[8]. A magnetoaerotaxia é o uso da magnetotaxia associada à aerotaxia, células magnetotáticas utilizam estes mecanismos combinados para nadar ao longo da coluna d'água (ambientes aquáticos estratificados), de locais com alta concentração

de oxigênio para ambientes microaeróbicos ou anaeróbicos. Assim, é possível que microrganismos magnetotáticos nadem nos sentidos paralelo e anti-paralelo ao campo magnético (além de outros movimentos), inclusive que permaneça em repouso, visto que há uma interação com o gradiente de oxigênio ( $O_2$ ) existente no meio e que isso pode determinar o provável local de acomodação [9].

A inclinação do campo magnético terrestre em relação à superfície é de extrema importância para as bactérias magnetotáticas. Sabe-se que quanto mais próximo aos polos magnéticos a inclinação do campo magnético tende a fazer  $90^\circ$  com relação à superfície horizontal. Foi observado que, das bactérias que se deslocam em um sentido preferencial das linhas de campo, as encontradas no hemisfério norte (acima do equador geomagnético) tendem a se deslocar em sentido oposto às encontradas no hemisfério sul (abaixo do equador geomagnético). Por essa propriedade, as primeiras foram classificadas como *north-seeking*, e as últimas *south-seeking*. A magnetoaerotaxia faz com que a busca pela localização mais ideal para a sobrevivência das bactérias magnetotáticas seja feita por movimento em uma dimensão, e não em três dimensões [10].

## 1.2 O MAGNETOSSOMO

A presença de magnetita no interior dessas bactérias foi uma das suspeitas iniciais, confirmada no trabalho de Blakemore e Frankel de 1979 [5]. Neste trabalho, culturas de bactérias foram desenvolvidas em ambientes com diversas concentrações diferentes de ferro (altas e baixas), resultando em micro-organismos magnéticos e não-magnéticos, respectivamente. A análise desses dados, juntamente com microscopias e outros estudos, como a espectroscopia Mossbauer – onde foi comparado o gráfico de uma magnetita com a de uma célula preparada - e a microscopia eletrônica de transmissão, que ajudou a visualizar o tamanho e formato dessas organelas intracelulares, levou à conclusão que as partículas responsáveis pela interação das bactérias com o campo magnético são monodomínios magnéticos (*single-domain*) de magnetita ( $Fe_3O_4$ ), sendo que o cristal é tão pequeno que os momentos de dipolos magnéticos atômicos estão alinhados no mesmo sentido e direção em todo o corpo do cristal [11], [12].

Os magnetossomos são organelas intracelulares compostas por cristais de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) ou greigita ( $Fe_3S_4$ ) contidas em vesículas de membrana fosfolipídica. Essas nanopartículas geralmente têm uma morfologia cuboctaedra, com cerca de 42 nm cada. Estão

dispostas em cadeia, formando uma linha praticamente reta dentro do micro-organismo e estão fixadas dentro da célula pelo citoesqueleto. Cada célula de bactéria magnetotática pode conter uma ou várias cadeias de magnetossomo, em geral dispostas de forma paralela ao eixo maior do microrganismo [13]. Esta organela intracelular é a responsável pelo dipolo magnético das bactérias magnetotáticas e a forma pela qual está disposta e fixada fisiologicamente no organismo faz com que elas se alinhem numa direção predominante em relação ao campo magnético externo.

### 1.3 *CANDIDATUS MAGNETOGLOBUS MULTICELLULARIS*

Em estudos de biomagnetismo, foi identificado um tipo especial de procarionte que é pluricelular, se diferenciando do comum desta categoria. Esse novo microrganismo, inicialmente denominado como agregado multicelular magnetotático (Magnetotatic Multicellular Aggregates – MMA) [14], foi coletado nas lagoas Rodrigo de Freitas e de Araruama, esta última sendo um ambiente hiper-salino (~55‰) na Região dos Lagos do Rio de Janeiro. Em outros trabalhos, esses seres também receberam denominações como procarionte magnetotático multicelular (Multicellular Magnetotatic Prokariote - MMP) e procarionte multicelular de várias células (Many-celled Magnetotatic Prokariote) [15].

*Candidatus Magnetoglobus Multicellularis* - *Ca. M. multicellularis* (Figura 1) é um procarionte magnetotático multicelular coletado na lagoa de Araruama, Rio de Janeiro. Possui formato aproximadamente esférico, composto por um número aproximado de 10 a 40 células Gram-negativas [16]. Seu raio varia em torno de 1 a 5 µm. O magnetossomo presente nesses organismos é composto geralmente por sulfeto de ferro – greigita (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>), com cada célula contendo, em geral, de 1 a 3 cadeias de magnetossomos [17]. Seu movimento - tal como previsto em organismos magnetotáticos - é direcionado pelo campo magnético externo, sendo no sentido das linhas de campo para as encontradas no hemisfério Norte (*North-seekers*), e o contrário para as coletadas no hemisfério Sul (*South-seekers*). É sabido que sua velocidade de translação em determinado ambiente pode ser afetada pelo comprimento de onda da iluminação predominante [18].



Figura 1: Micrografia Eletrônica de Varredura de uma *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*. Escala da barra 2  $\mu\text{m}$ . Fonte: Keim et al (2012).

O livro editado por Dirk Schüler em 2006, denominado de “*Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*” [19], apresenta um capítulo escrito por Keim et al., que faz uma extensa revisão dos conhecimentos acumulados acerca dos MMPs até aquela época. Em um breve resumo deste capítulo, os parágrafos seguintes discorrem sobre as principais características destes organismos.

Os MMPs já foram coletados em diversos locais do mundo, e todos compartilham algumas similaridades: possuem tamanho variando entre 3 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro [15], [20]; são compostos por células procarióticas, aparentemente dispostas com uma simetria helicoidal, de forma que todas as células fazem fronteira simultaneamente com o ambiente externo e interno do organismo; apresentam glicocálix; contam com muitos flagelos na parte exposta ao meio externo; células isoladas (separadas do organismo) não apresentam mobilidade [17]; e os organismos provavelmente têm um ciclo de vida único [20].

Estudo de filogenia dos MMPs coletados na costa da Nova Inglaterra (EUA) mostrou que o sequenciamento do gene 16S rDNA destes microrganismos está relacionado com o grupo de bactérias redutoras de sulfato da classe das Deltaproteobacteria [21].

A ocorrência de MMPs geralmente acontece em ambientes anaeróbicos, salobro a hipersalino, ricos em sulfeto, na coluna d’água em lagoas estratificadas, ou na camada de sedimentos em ambientes aquáticos não estratificados. Os MMPs, enquanto procariontes produtores de greigita, são achados na zona anaeróbia, logo abaixo da zona de transição óxico-anóxica. Devido à limitada região onde são encontrados, acredita-se que os MMPs, se

locomovem de acordo com o gradiente de substâncias específicas presentes no meio, no caso destes organismos, em vez de concentração de oxigênio, a quimiotaxia estaria relacionada concentração de ferro ou enxofre [22].

As células procarióticas no MMP estão dispostas em um arranjo aproximadamente helicoidal, de forma que o organismo apresenta uma geometria esférica. A estrutura do organismo é tal que cada célula faz fronteira com o meio externo e com o compartimento interno do organismo. Devido a esta disposição, as células assumem um formato piramidal, com sua base voltada para o meio externo, e o ápice para o compartimento interno. Este compartimento, por sua vez, contém pequenas vesículas de membranas e filamentos ligando os ápices de cada pirâmide (célula) e pode ser responsável pela comunicação entre as células para difusão de moléculas solúveis. A base da pirâmide é levemente arredondada e, por ser a parte em contato com ambiente externo à célula, é por onde ela absorve os nutrientes [14], [17].

O envelope celular contém a dupla membrana característica das células Gram-negativas, em alguns casos contendo uma fina camada de peptidoglicano no espaço periplasmático [15], [17]. A superfície de cada membrana é diferente nas diversas partes da célula, devido a polarização e especialização de cada uma dessas regiões, sendo que as membranas de contato com as outras células são fortemente acopladas [17]. A base da pirâmide celular apresenta uma superfície com muitos flagelos de aproximadamente 15,9 nm de diâmetro e 0,9 a 3,8  $\mu\text{m}$  de comprimento, e uma cápsula compostas por fibras radiais, provavelmente compostas por polissacarídeos [17], [23].

O número total de magnetossomos de sulfeto de ferro (greigita) nos MMPs varia de 300 a aproximadamente 1000 [14], [24], sendo que cada célula pode conter de 2 a 65 (média de 31) desses cristais, os quais possuem dimensões que podem variar de 30 a 120 nm [15]. Os magnetossomos estão organizados em grupos planares dentro do citoplasma, próximo às fronteiras do organismo, paralelos à superfície externa [17], [25]. Considerando a disposição em simetria esférica, cada placa de magnetossomo está a uma distância máxima da placa da célula adjacente [23]. Cristais no magnetossomo de MMP geralmente são compostos por sulfetos de ferro, mas raramente é encontrada também a magnetita, que podem ocorrer de forma exclusiva ou combinada com cristais de greigita. Esses cristais possuem formato irregular na maioria das vezes, entretanto alguns podem apresentar formato aproximadamente cuboidal, de paralelepípedo [26], [27], barril ou projétil [28].

Além do usual formato esférico, os MMPs podem apresentar geometria elíptica ou em formato de oito [15], [25], e essas outras apresentações estão relacionadas ao ciclo de vida do organismo. Neste ciclo, o MMP é esférico na maior parte do tempo, porém, ao se reproduzir, passa por alguns estágios: primeiro aumenta de tamanho, duplicando o volume, mantendo o formato esférico e o número de células; na próxima fase, cada célula se divide ao meio simultaneamente, assim duplicando o número de células no organismo, sem modificar o arranjo e mudança significativa no tamanho do organismo; após o MMP começa a assumir um formato elíptico, depois em formato de oito, quando começa a acontecer a torção entre as duas metades; por fim, divide-se em duas partes equivalentes, recomeçando o ciclo de vida. Este ciclo pode ser representado matematicamente pela parametrização de curvas da família Oval de Cassini. A expressão utilizada para isto é:

$$r^4 + a^4 - 2a^2r^2 \cos(2\theta) = b^4 \quad (1)$$

onde  $r$  e  $\theta$  são as coordenadas polares usuais (raio e ângulo), e  $a$  e  $b$  são os parâmetros associados ao formato e o tamanho da curva, respectivamente. O formato do organismo é obtido a partir da superfície formada pela revolução da curva. Quando  $a = 0$ ,  $b = 0$ , e a curva assume um formato circular e  $b = r$ . Ao variar o parâmetro  $a$  de 0 a 1.2, a curva vai perdendo seu formato de circunferência e ficando cada vez mais elíptica até  $a = 0,9999$ , e ao alcançar  $a > 1$ , ocorre a separação em duas curvas, finalizando o ciclo do MMP.

Analisando a mobilidade dos MMPs quando submetidos a um campo magnético homogêneo, foram realizadas as seguintes observações para quatro tipos de movimentos[29]:

- movimento livre: em linha reta ou trajetória helicoidal (com o eixo de simetria paralelo ao campo magnético) com velocidades em torno de 90  $\mu\text{m/s}$ ;
- rotação: em torno do próprio eixo, sempre no sentido da trajetória helicoidal;
- ping-pong ou movimento de escape: deslocamento para trás, no sentido contrário ao previsto (considerando a polaridade do organismo), alcançando algumas dezenas de micrometros, seguido de um deslocamento para frente;
- caminhada: acontece quando o MMP está na interface entre a água e o ar, situação na qual ele se desloca de forma livre, numa trajetória complexa, contudo mantendo o sentido de rotação.

### 1.3.1 Configuração Magnética do *Ca. M. multicellularis*

Em Acosta-Avalos et al.[30] há uma detalhada investigação sobre a otimização energética da distribuição de momentos magnéticos no *Ca. M. multicellularis*, com objetivo de chegar à mais provável configuração dos dipolos no organismo. O modelo se baseia na proposta de que o *Ca. M. multicellularis* tem um arranjo helicoidal (em espiral), conforme o descrito por Keim et al.[29]. Dessa forma, os cálculos fundamentaram-se na equação paramétrica da hélice em coordenadas cartesianas para três dimensões (x, y, z). Então leva-se em consideração que esta hélice se arranja num formato de esfera, com raio R e número de voltas L (loops). Logo a equação da hélice fica:

$$\begin{aligned}x &= (R^2 - z^2)^{1/2} \cos(t) \\y &= (R^2 - z^2)^{1/2} \sin(t) \\z &= \left[ \frac{t}{L\pi} - 1 \right] \cdot R\end{aligned}\tag{2}$$

onde  $-R \leq z \leq R$ ,  $0 \leq t \leq 2L\pi$ .

Os vetores magnéticos associados aos magnetossomos estão dispostos de forma tangencial à superfície da esfera, vide a posição das cadeias próximas à superfície da célula. Devido ao volume dos magnetossomos comparado ao da célula, os momentos magnéticos não pareados podem ser considerados como um ponto de dipolo. Cada momento possui uma inclinação relativa à curva da hélice, quando o ângulo dessa inclinação é  $0^\circ$  significa que ele é tangente à curva. Neste trabalho, é considerado que todos os vetores de momento magnético do *Ca. M. multicellularis* possuem a mesma inclinação e a mesma magnitude.

Para o cálculo da energia magnética E da distribuição na presença de um campo externo  $\mathbf{B}_{ext}$ , é considerada a seguinte equação:

$$E = \sum_{j>i} u_{ij} - \sum_i \mathbf{m}_i \cdot \mathbf{B}_{ext}\tag{3}$$

onde  $u_{ij}$  é a interação energética dos momentos magnéticos  $\mathbf{m}_i$  e  $\mathbf{m}_j$ . Escrevendo  $u_{ij}$  com a expressão:

$$u_{ij} = (\mu_0 m_0^2 / 4\pi r_{ij}^3) (\mathbf{m}_{ui} \cdot \mathbf{m}_{uj} - 3(\mathbf{m}_{ui} \cdot \mathbf{r}_{uij})(\mathbf{m}_{uj} \cdot \mathbf{r}_{uij})) \quad (4)$$

em que  $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i$  é a posição relativa entre os dois vetores  $\mathbf{m}_i$  e  $\mathbf{m}_j$ ,  $\mathbf{m}_{ui}$  e  $\mathbf{m}_{uj}$  são vetores unitários ( $\mathbf{m}_i = m_0 \mathbf{m}_{ui}$ ), assim como  $\mathbf{r}_{uij}$  de  $\mathbf{r}_{ij}$ , e  $\mu_0$  é a permeabilidade magnética no vácuo. A partir desta expressão, é possível concluir que o valor de  $u_{ij}$  depende fortemente da orientação relativa entre os momentos magnéticos interagentes.

Há outros parâmetros importantes definidos no estudo:

1. O vetor tangente à hélice  $\mathbf{t}_i$ , o normal  $\mathbf{n}_i$  ( $n_i = r_i / |r_i|$ ) e o binormal tangente  $\mathbf{t}_{pi}$  ( $\mathbf{t}_{pi} = \mathbf{t}_i \times \mathbf{n}_i$ ). O vetor tangente é calculado pela definição do cálculo diferencial:

$$t_i = \frac{\left(\frac{d\mathbf{r}_i}{dt}\right)}{\left(\left|\frac{d\mathbf{r}_i}{dt}\right|\right)} \quad (5)$$

2. O vetor momento magnético não está exatamente alinhado com a tangente da curva, possuindo um ângulo de inclinação  $\alpha$  relativo à tangente da hélice. Dessa forma, o momento magnético em função do ângulo de inclinação em cada célula pode ser escrito como:

$$\mathbf{m}_{ui}(\alpha) = \cos(\alpha)\mathbf{t}_i + \sin(\alpha)\mathbf{t}_{pi} \quad (6)$$

Neste contexto, assumindo que todos os momentos magnéticos possuem a mesma inclinação com a curva da hélice, foram calculados das várias situações energéticas para o organismo variando o ângulo alfa, e obtendo valores de máximo e mínimo de energias, que superam a energia térmica ambiente  $\kappa T$  ( $4 \times 10^{-21} \text{J}$ ).

O modelo mostrou que a configuração magnética de mínima energia é aquela cujos momentos magnéticos estão alinhados com os meridianos do *Ca. M. multicellularis*, ou seja, dispostos em uma inclinação perpendicular às curvas do espiral.

#### 1.4 O USO DAS VOLTAS EM U (U-TURN) NO ESTUDO DO *Ca. M. multicellularis*

Procedimentos diversos - como medidas do ângulo de deslocamento em relação ao campo magnético, estimativas por micrografias eletrônicas, volta em U, dentre outros [31]–[33] - já foram realizados para se chegar ao valor do momento magnético de um microrganismo magnetotático. A volta em U (ou U-turn), por sua vez, trata da trajetória executada pelo microrganismo em uma situação na qual o sentido do campo magnético externo é invertido, fazendo com que ele execute uma curva que mudará em 180° o sentido de sua trajetória (formato da letra “U”; Figura 2).

Para utilizar a volta em U em proveito dos cálculos de momento magnético das bactérias magnetotáticas, foi apresentado o modelo de Bean [33], [34], que mostra como obter o momento de um microrganismo a partir do tempo da volta em U ou do diâmetro da curva executada por ele. Um dos fundamentos que baseia esse modelo é a estimativa de valor médio da velocidade de migração ( $\langle V \rangle$ ) de um organismo magnetotático na direção do campo magnético homogêneo:

$$\langle V \rangle = \langle \cos \theta \rangle V_0 \quad (7)$$

onde  $\theta$  é o ângulo de desvio em relação ao campo externo e  $V_0$  é a velocidade do microrganismo. O termo  $\langle \cos \theta \rangle$  é calculado da seguinte forma assumindo a estatística de Boltzmann:

$$\langle \cos \theta \rangle = \coth \frac{mB_0}{\kappa T} - \frac{1}{mB_0/\kappa T} \quad (8)$$

que se trata da função de Langevin para sistemas paramagnéticos, onde  $\mathbf{m}$  é o momento magnético,  $\mathbf{B}_0$  é o campo magnético externo,  $\kappa$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura absoluta.

Para o cálculo do tempo da volta em U, parte-se do princípio de que a soma dos torques atuantes sobre o organismo é nula, ou seja, o torque devido ao campo magnético externo é igual ao torque da resistência devido à viscosidade do meio. Para um organismo esférico, isto é transcrito em termos matemáticos como:

$$mB_0 \sin \theta - 8\pi\eta R^3 \left( \frac{d\theta}{dt} \right) = 0 \quad (9)$$

sendo  $\mathbf{R}$  é o raio do organismo, e  $\boldsymbol{\eta}$  o coeficiente de viscosidade do meio. Desenvolvendo e integrando os termos tem-se:

$$\frac{mB_0}{8\pi\eta R^3} dt = \frac{1}{\sin \theta} d\theta \quad (10)$$

$$\frac{mB_0}{8\pi\eta R^3} \int_0^t dt = \int_{\theta_i}^{\theta} \frac{1}{\sin \theta} d\theta \quad (11)$$

$$\frac{t}{T_0} = \ln(\cot \theta - \csc \theta) - \ln(\cot \theta_i - \csc \theta_i) \quad (12)$$

$$\frac{t}{T_0} = \ln \tan \frac{\theta}{2} - \ln \tan \frac{\theta_i}{2} \quad (13)$$

onde  $T_0 = 8\pi\eta R^3 / mB_0$ .

Se  $\theta_i$  é muito pequeno, tal que  $\tan \theta_i / 2 \sim \theta_i / 2$ ; e se  $mB_0 \gg \kappa T$ , tomando o valor esperado como o próprio ângulo  $\theta_i$  da função de Langevin (1.4.2), podemos concluir que  $\theta_i \sim (2\kappa T / mB_0)^{1/2}$ . Assim:

$$\ln\left(\tan\frac{\theta_i}{2}\right) \sim \ln\left(\frac{\theta_i}{2}\right) \sim \ln\left(\frac{2\kappa T}{mB_0}\right)^{1/2} \quad (14)$$

Então o tempo  $\tau$  de reversão (volta em U) e o diâmetro da volta L, pode ser calculado pelas expressões:

$$\tau = \frac{8\pi\eta R^3}{mB_0} \ln\left(\frac{2mB_0}{\kappa T}\right) \quad (15)$$

$$L = \int_0^\infty v_0 \sin\theta dt = v_0 \int_0^\pi \frac{8\pi r \eta R^3 d\theta}{mB_0} = \frac{8\pi^2 R^3 v_0 \eta}{mB_0} \quad (16)$$

onde  $\tau$  (s) é o tempo para completar a inversão do sentido da trajetória. No caso deste trabalho,  $\eta$  é o coeficiente de viscosidade da água ( $\eta_{H_2O} = 10^{-3}$  Pa.s),  $R$  está em  $\mu\text{m}$ ,  $m$  em unidades de  $10^{-15}$  A.m<sup>2</sup>,  $T$  em Kelvins (K),  $v$  em  $\mu\text{m/s}$ , que é a velocidade de deslocamento dos microrganismos antes da inversão do campo. O campo magnético  $B_0$  é dado em mT (militesla).

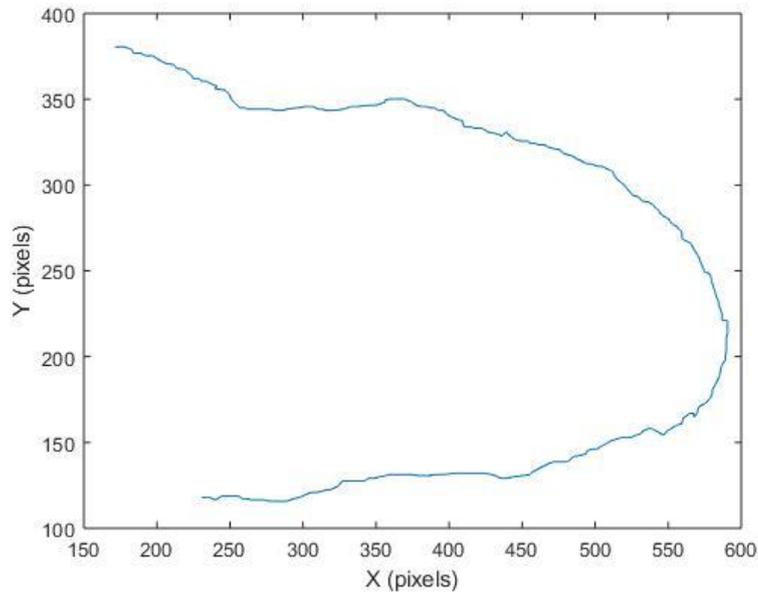


Figura 2: Amostra de um gráfico obtido com a execução de uma volta em U por um *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* submetido a uma inversão de campo magnético.

O procedimento da volta em U já foi utilizado para outros estudos, como a investigação dos efeitos do comprimento de onda da luz incidente sobre o tempo da volta [18] e, no caso do

cálculo do momento, para o controle do movimento (através de sistema de manipulação magnética) de microrganismos magnetotáticos em circuito fechado [35], em estudos de biomineralização de ferro por bactérias magnetotáticas [36].

## **1.5 EFEITOS DE LUZ EM *Ca. M. multicellularis* E O MECANISMO DE PARES RADICAIS**

A interferência da luz em seres vivos que interagem de alguma forma com o campo magnético já foi estudada em diversos aspectos. Trabalhos foram realizados em espécies como pássaros [37], bactérias magnetotáticas [9], em MMPs - especialmente o *Ca. M. multicellularis*, foco desse trabalho - dentre outros. Em termos de bactérias magnetotáticas, Frankel [9] notou a fototaxia em *Magnetococcus marinus* cepa MC-1 para iluminação de comprimento de onda curto ( $\lambda \leq 500$  nm), mas não para a luz vermelha. Observou-se também que a breve exposição (menos de 2s) à iluminação ultravioleta (365 nm) de alta intensidade faz com que a direção de nado dos MMPs seja invertida [38].

Tratando-se especificamente do *Ca. M. multicellularis*, a influência da luz no movimento desses microrganismos foi investigada nos três trabalhos [18], [39], [40], produzindo resultados que deixam claro a fotocinesia, ou seja, a relação da iluminação (comprimento de onda e intensidade da luz) com a velocidade dos microrganismos. A dependência com a luz também foi associada com a magnetossensibilidade, demonstrando uma complexidade maior que a esperada neste processo. No primeiro trabalho [18], resultados obtidos mostram um aumento na velocidade média dos *Ca. M. multicellularis* para a luz vermelha (628 nm) e uma redução para a cor verde (517 nm), esta última também reduziu o tempo da volta em U, associado ao momento magnético do organismo (Tabela 1 e TABELA 2). Neste caso, a intensidade da luz nas cores azul, verde, amarela e vermelha foi, respectivamente, 0,8; 0,46; 0,05 e 0,16  $\text{Wm}^{-2}$ , e a intensidade do campo de 0,14mT.

Tabela 1: Resultados obtidos para a média de velocidades dos *Ca. M. multicellularis* submetidos aos comprimentos de onda indicados na primeira coluna e a um campo de 0,14mT. Fonte: ref [18].

Luz	N	Velocidade ( $\mu\text{m/s}$ )	Erro ( $\mu\text{m/s}$ )
<b>Azul (469 nm)</b>	88	89,1	2,3
<b>Verde (517 nm)</b>	82	67,8	1,8
<b>Amarelo (596 nm)</b>	101	93,1	1,8
<b>Vermelho (628 nm)</b>	96	119,6	2,2

Tabela 2: Resultados obtidos para a média dos tempos de execução da volta em U dos *Ca. M. multicellularis* submetidos à iluminação nos comprimentos de onda indicados na primeira coluna e a um campo de 0,14 mT. Fonte: ref [18].

Luz	N	Volta em U (s)	Erro (s)
<b>Azul (469 nm)</b>	18	0,98	0,05
<b>Verde (517 nm)</b>	18	0,87	0,03
<b>Amarelo (596 nm)</b>	17	1,09	0,06
<b>Vermelho (628 nm)</b>	12	1,09	0,10

Em 2015, continuando os estudos no tema, Azevedo e Acosta-Avalos [39] fizeram experimentos com os mesmos comprimentos de onda indicados anteriormente, porém variando a intensidade do campo magnético e da potência da luz. Para campos magnéticos de intensidade próxima ao geomagnético (0,23 Oe ou  $\approx 0,023\text{mT}$ ) o experimento não mostrou diferenças significativas para as médias de velocidades sob a iluminação das diversas luzes aplicadas. Entretanto, para campos de intensidade maior que 0,4 Oe, essas diferenças se evidenciaram, mostrando similaridade com o estudo anterior, apesar de algumas outras variações para valores de campo mais intensos (potência da luz  $153 \mu\text{W}$ ). Diante desses resultados, foi possível concluir que a fotocinesia guarda dependência com o campo magnético. Em relação ao experimento variando o campo e a irradiância da luz, a velocidade média dos organismos mostrou dependência dos dois fatores, mantendo a tendência de diminuição para a o comprimento de onda relacionado à luz verde.

Em um terceiro estudo [40], foi introduzido a aplicação do campo magnético oscilante, em radiofrequência – RF, na frequência Zeeman, com o objetivo de investigar a influência de moléculas com mecanismo de pares radicais (*radical pair mechanism* – RPM) na resposta de *Ca. M. multicellularis* para a luz e para intensidade do campo magnético. A primeira análise foi para a comparação entre a luz vermelha e a do microscópio (controle), onde ficou evidente o efeito do campo RF reduzindo a média de velocidade dos *Ca. M. multicellularis* para a luz

vermelha, colocando num patamar estatisticamente similar ao do microscópio (Tabela 3). Após foi realizada a comparação entre as luzes azul, verde e vermelha, conforme a Tabela 4. Adiante, fez-se a análise anterior para duas intensidades de campo diferentes, 0,16 e 2,66 mT, com suas respectivas radiofrequências 4,4 e 74,5 MHz, com resultados demonstrados na Tabela 5. Além disso, também foi analisado a orientação dos *Ca. M. multicellularis* em relação ao campo magnético aplicado nas diversas condições indicadas, o parâmetro utilizado para essa análise foi o cosseno do ângulo entre a velocidade e o campo magnético. Esses experimentos foram realizados a uma potência de luz de 110  $\mu$ W. Os resultados demonstraram que, sob a iluminação verde e vermelha, a fotocinesia é afetada por campo RF, mas não a luz azul, sugerindo o envolvimento de molécula com RPM para além do criptocromo.

Tabela 3: Resultados para a comparação entre *Ca. M. multicellularis* iluminados com luz vermelha e a luz do microscópio, com a adição da RF. Fonte: ref [40].

Luz	N	Velocidade ( $\mu$ m/s)	Erro ( $\mu$ m/s)
<b>B = 0,4 mT; RF = 11,5 MHz</b>			
Microscópio	35	87,6 <sup>a</sup>	2,8
Microscópio+RF	38	111,4 <sup>b</sup>	3,8
Vermelho (628 nm)	41	114,5 <sup>b</sup>	3,5
Vermelho+RF	31	80,7 <sup>a</sup>	4,5

Tabela 4: Resultados para a comparação entre *Ca. M. multicellularis* iluminados com as luzes azul (controle), verde e vermelha, com a adição da radiofrequência. Fonte: ref [40].

Luz	N	Velocidade ( $\mu$ m/s)	Erro ( $\mu$ m/s)
<b>B = 0,4 mT; RF = 11,5 MHz</b>			
Azul (469 nm)	48	90,6 <sup>a</sup>	2,6
Azul+RF	41	89,9 <sup>a</sup>	1,7
Verde (517 nm)	49	75,9 <sup>b</sup>	1,4
Verde+RF	54	83,7 <sup>a</sup>	2,1
Vermelho (628 nm)	54	97,4 <sup>c</sup>	1,8
Vermelho+RF	42	83,6 <sup>a</sup>	1,6

Tabela 5: Comparação entre velocidade média dos *Ca. M. multicellularis* submetidos às condições de iluminação azul, verde, vermelho, e adição de RF para campos de 0,16 e 2,66 mT. Fonte: ref [40].

Luz	N	Velocidade ( $\mu\text{m/s}$ )	Erro ( $\mu\text{m/s}$ )
<b><math>B_0=0.16</math> mT; RF = 4,4 MHz</b>			
Azul (469 nm)	32	84,8	4,20
Azul+RF	40	94,6	3,20
Verde (517 nm)	43	96,8	2,70
Verde+RF	39	78,4	2,70
Vermelho (628 nm)	51	110,4	2,50
Vermelho+RF	43	94,0	3,10
<b><math>B_0 = 2,66</math> mT; RF = 74.5 MHz</b>			
Azul (469 nm)	46	113,0	4,2
Azul+RF	48	112,6	2,6
Verde (517 nm)	43	95,2	2,3
Verde+RF	41	124,5	2,8
Vermelho (628 nm)	37	113,9	3,2
Vermelho+RF	43	108,3	2,3

A principal linha de investigação para a química envolvida no processo de percepção do campo magnético correlacionado à iluminação é o Mecanismo de Pares Radicais ou RPM (do inglês, *Radical Pairs Mechanism*). Isto pode ocorrer quando a incidência de um fóton excita um par de moléculas, transferindo um elétron de uma espécie A para outra B, criando pares de radicais transitórios (vida curta) simultaneamente, de forma que o spin de dois elétrons, um de cada radical, estão correlacionados. Na formação desses pares, os elétrons estão em moléculas que possuem um elétron livre, não pareado, que, em relação a um elétron na mesma condição em outra molécula, pode estar em dois estados de spin:  $\uparrow$  ou  $\downarrow$  (*up* ou *down*). O par de spins eletrônicos pode estar antiparalelo ( $\uparrow\downarrow$ , estado singleto) ou paralelo ( $\uparrow\uparrow$ , estado tripleto). Como o spin de cada elétron tem um momento magnético associado, a reação química relacionada a cada estado de spins (singleto ou tripleto) – neste caso, os estágios de decaimento ou retorno para o estado menos energético - pode ser influenciada pelos campos magnéticos interno e externo [37]. Tudo isso implica que a forma com que uma espécie de ser vivo percebe o campo magnético pode mudar de acordo com o comprimento de onda da radiação que predomina no ambiente, caso esta espécie possua as moléculas que formam os pares radicais.

Os efeitos do campo magnético na formação dos pares radicais (estado tripleto) podem ser cancelados se sobre as moléculas atuar um campo magnético oscilante na frequência

Zeeman e ortogonal ao campo magnético externo, constituindo um método para verificar se o RPM está envolvido no processo de magnetorrecepção [40]. Para definir a frequência do campo magnético oscilante, utiliza-se da seguinte equação[41]:

$$f_{RF} = (28.025 \text{ MHz} \times \text{mT}^{-1}) \times B_0 \quad (17)$$

Onde  $B_0$  é o campo magnético aplicado ao sistema.

## 1.6 OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação é estudar o efeito da luz monocromática no tempo da volta em U e no cálculo do momento magnético do procarionte *Candidatus Magnetoglobus multicellularis* (*Ca. M. multicellularis*), a influência do tamanho do organismo nestes aspectos, e investigar se um campo magnético oscilando na frequência de Zeeman interfere nesses parâmetros.

## CAPÍTULO 2: METODOLOGIA

### 2.1 COLETA E MANUTENÇÃO DO *Ca. M. multicellularis*

As amostras de *Ca. M. multicellularis* foram coletadas na Lagoa de Araruama (22°50'S; 42°13'O), Região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro e conservadas em aquários próximas a janela do laboratório, onde ficavam expostas à luz solar durante o dia. Esse material ficava intocável por um ou dois dias para a promoção do assentamento dos sedimentos (Figura 3).



Figura 3: Armazenamento e conservação dos microrganismos magnetotáticos. Os sedimentos da Lagoa de Araruama são depositados nos aquários à direita da foto.

### 2.2 ISOLAMENTO

Após estar pronta para estudo, uma quantidade pequena (em torno de 100 ml) do material (sedimento + líquido) é coletado do aquário com uma pipeta e realocada em um concentrador de vidro (Figura 4). Um ímã que fica próximo a uma das pontas do concentrador produz o campo magnético necessário para que os micro-organismos nadem até a ponta do concentrador e, após 3 a 4 minutos, disponíveis para serem coletados através de uma pipeta menor, com bico fino o suficiente para sugar o material proveniente da ponta do concentrador

(Figura 5). Com a pipeta menor, coleta-se uma pequena quantidade de fluido que é imediatamente depositada na lâmina preparada do microscópio.



Figura 4. Concentrador de vidro e imã.



Figura 5: Coleta do líquido através do bico do concentrador.

### **2.3 MICROSCÓPIO ÓTICO INVERTIDO E O SISTEMA DE OBSERVAÇÃO**

O equipamento utilizado para observação é o microscópio invertido Nikon Eclipse TS100F (modelo trinocular), que conta com uma lâmpada de halogênio (6v-30W). A câmera acoplada ao microscópio é a Lumenera Infinity 1 (Figura 6). Além da lâmpada padrão do microscópio, foram utilizadas lâmpadas monocromáticas de LED, da marca Xelux, modelo PAR20, para iluminação com as cores azul (469 nm), verde (517 nm) e vermelho (628 nm). As imagens captadas são reproduzidas no software Infinity Capture, e gravadas na resolução 600x800 pixels, com uma taxa de 82 frames por segundo.



Figura 6: Microscópio óptico utilizado como sistema de observação.

A lâmina do microscópio, por sua vez, fica acoplada a um par de bobinas (Figura 7), que produz um campo magnético controlável (homogêneo na região da amostra) através de uma fonte de tensão regulável da marca “SME Instrumentos” (Figura 8), em um circuito que pode ter o sentido da corrente trocado por um inversor integrado à sua estrutura. A intensidade e sentido do campo gerado por essa bobina é medida por um magnetômetro digital (GlobalMag Model TLMP-HALL 050). Também é acoplado à região da amostra no microscópio uma bobina quadrada para a geração da radiofrequência (uma antena de rádio AM adaptada), que é superposta em torno do par de bobinas, em orientação perpendicular a estas, com a possibilidade de ajuste de frequência por um gerador de funções da marca Agilent, modelo “33250A” (Figura 9).

A gota de amostra depositada na lâmina do microscópio é filmada e gravada quando exposta a um campo magnético que seria invertido depois de algum tempo (2 a 4 segundos). Esta inversão faz com que os *Ca. M. multicellularis* saiam da borda da gota nadando no novo sentido (mesma direção) do campo magnético. Após um tempo (aproximadamente 0,5s), o

campo é invertido novamente para o sentido original. Assim, os microrganismos de *Ca. M. multicellularis*, ao se reorientarem devido à inversão de polaridade do campo, realizam a volta em U.



Figura 7: Bobina de Helmholtz acoplada à lâmina.



Figura 8: Fonte de alimentação com regulação de tensão.



Figura 9: Gerador de funções para o campo magnético oscilante.

## **2.4 LUZ MONOCROMÁTICA DO MICROSCÓPIO**

Várias gotas da amostra de *Ca. M. multicellularis* são visualizadas sob a iluminação monocromática nas cores azul, verde e vermelho, com comprimentos de onda iguais a 469, 517 e 628 nm, respectivamente; e a luz do microscópio (controle), que é a lâmpada de halogênio supracitada, e que para efeitos de medida da intensidade (potência), foi considerado o pico no comprimento de onda 469 nm (luz azul).

Para aplicação da luz monocromática o microscópio foi adaptado da seguinte forma: retirando-se a lâmpada original e posicionando em seu lugar uma lâmpada de LED monocromática, nos comprimentos de onda supracitados. O posicionamento ocorre de tal forma que a luz da lâmpada monocromática é convergida para a região da amostra, tal como a original do microscópio.

Objetivando o mínimo de influências externas ao aparato experimental, as janelas da sala onde funciona o microscópio tiveram suas persianas fechadas, assim como as luzes da sala foram desligadas. Tudo foi feito para que somente a iluminação de interesse do método chegasse na amostra.

## **2.5 GRAVAÇÃO DOS VÍDEOS COM LUZ MONOCROMÁTICA**

As filmagens foram realizadas com a amostra submetida a uma iluminação com potência em torno 121 $\mu$ W, medida com um potenciômetro digital (Newport Optical Power Meter Model 1916-C), calibrado para cada comprimento de onda.

Assim, para cada tipo de iluminação foram realizadas filmagens nas seguintes circunstâncias:

- Campo 2 Gauss: sem radiofrequência e com radiofrequência ajustada em 5.6 MHz (frequência de Zeeman);
- Campo 20 Gauss: sem radiofrequência e com radiofrequência ajustada em 56 MHz.

Importante destacar que, a cada série de medidas, também foi feito no microscópio a filmagem da escala com a lente de aumento utilizada, que foi a de 20x. Esse procedimento é realizado com a finalidade de possibilitar a conversão dos dados de pixels para  $\mu\text{m}$ . Assim, uma lâmina de microscópio com uma barra de 1 mm dividido em 100 partes iguais foi filmada no microscópio, e no software *ImageJ* é medido a quantidade de pixels entre duas marcações consecutivas, obtendo dessa forma o fator de conversão pixels para micrômetros.

## 2.6 ANÁLISE DAS VOLTAS EM U

A forma escolhida para se chegar ao cálculo do momento magnético dos microorganismos foi o método das voltas em U. Para isso, os *Ca. M. multicellularis* são filmados no microscópio sob o seguinte procedimento: ativa-se o campo magnético do par de bobinas (homogêneo) para que os microrganismos se concentrem na extremidade da gota (foco da filmagem), após um tempo inverte-se o campo, quando os organismos se reorientam e começam a nadar no sentido da outra extremidade, algum tempo depois ocorre uma segunda inversão do campo, neste caso para que o organismos realizam a volta em U (segunda reorientação) e retornem para a extremidade inicial. Os vídeos gravados foram reproduzidos no software *ImageJ*, onde traçou-se os pontos da trajetória daqueles *Ca. M. multicellularis* que conseguiram concluir a volta dentro dos limites da resolução (Figura 2). Para definir onde começa e onde termina a volta em U, é construído o gráfico da derivada temporal do deslocamento do corpo no eixo X (horizontal), ou seja, a velocidade do microrganismo em relação ao eixo X. Neste último gráfico, é escolhido manualmente o ponto do gráfico onde a velocidade começa a decrescer “continuamente” (segunda inversão do campo magnético), depois o ponto onde se “estabiliza” no sentido contrário, ou seja, no semieixo negativo do gráfico (Figura 10). A diferença entre as coordenadas de tempo marcadas (abscissa do gráfico de velocidade) dá o tempo de execução da volta em U pelo microrganismo.

O tempo necessário para a conclusão da volta em U por cada *Ca. M. multicellularis* é dividido pelo cubo do raio do respectivo organismo. O raio também é obtido através de marcação de pontos no vídeo, neste caso das extremidades do *Ca. M. multicellularis*: quatro pontos, dois para medir o diâmetro no eixo horizontal, dois para o eixo vertical, a média das duas medidas foi considerada como o diâmetro aproximado do indivíduo. Dessa forma, os parâmetros coletados no experimento (tempo e raio) são isolados no lado esquerdo da equação (10), pois estes são os parâmetros experimentais, ficando a equação com o seguinte aspecto:

$$\frac{\tau}{R^3} = \frac{8\pi\eta}{mB_0} \ln\left(\frac{2mB_0}{\kappa T}\right) \quad (18)$$

Então o momento magnético é estimado a partir do cruzamento de valores obtidos dos dois lados da equação: valores experimentais vs. tabela de resultados do lado direito da equação (18) para valores de  $m$  variando de 0,01 a  $250 \cdot 10^{-15}$  A.m<sup>2</sup>.

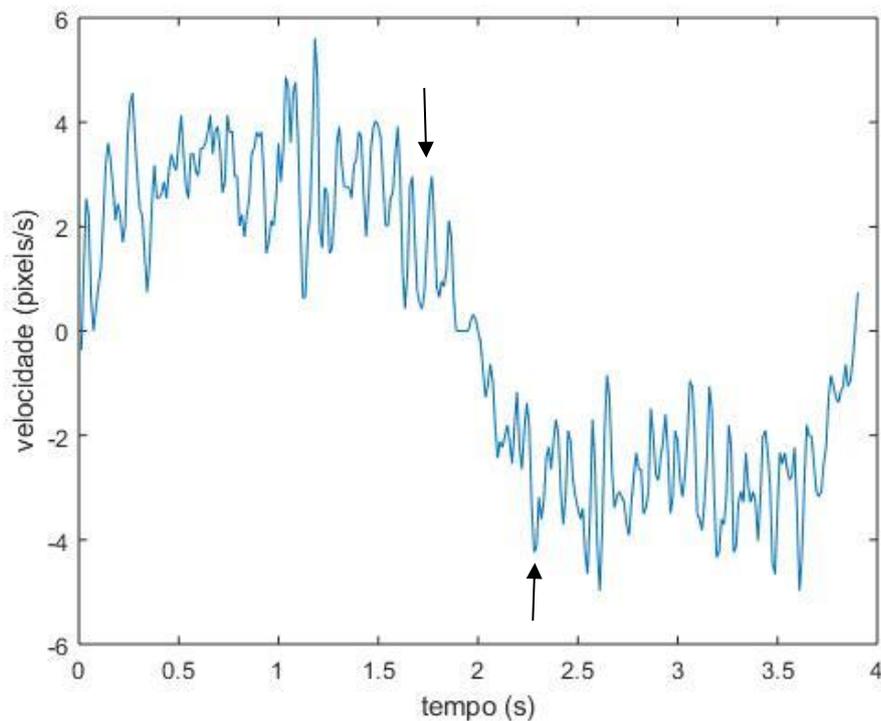


Figura 10: Gráfico da velocidade de um organismo sujeito à inversão do campo magnético (~0.2 mT). Os pontos escolhidos estão indicados pelas setas.

Além do tempo da volta em U, foi calculado também a velocidade de deslocamento dos *Ca. M. multicellularis*, usando o método da melhor reta para os deslocamentos horizontal e vertical em função do tempo (entenda-se aqui que a composição dos deslocamentos horizontal e vertical se trata do eixo da trajetória helicoidal executada pelo microrganismo). A velocidade é calculada somente para o trecho de volta, a partir do ponto do tempo em que se estabiliza para o retorno do *Ca. M. multicellularis*.

Tabela 6: Data e horário de realização dos experimentos. H1V: horário do primeiro vídeo; HUV: horário do último vídeo.

Experimento	Luz	Dia	H1V	HUV
I	Verde (517 nm)	25/10/2017	17:23	19:14
	Azul (469 nm)	25/10/2017	20:21	23:03
	Vermelho (628 nm)	24/01/2018	20:53	23:07
	Controle	25/01/2018	18:42	20:57
II	Vermelho (628 nm)	25/07/2018	20:02	22:51
	Verde (517 nm)	29/08/2018	17:36	19:24
	Azul (469 nm)	29/08/2018	20:35	22:08
III	Azul (49 nm)	11/10/2018	19:40	23:57
	Vermelho (628 nm)	12/10/2018	9:56	12:46
	Verde (517 nm)	12/10/2018	14:08	16:06

## 2.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os cálculos indicados na seção anterior, para obtenção do tempo da volta em U, da velocidade dos *Ca. M. multicellularis*, assim como do raio e do momento de cada microrganismo ( $\tau/R^3$ ), foram realizadas através do software Matlab MathWorks 2018A, também uma parte dos dados foram obtidos através do Origin 6.0, para efeitos de dupla checagem.

Outro dado calculado é a energia cinética de cada organismo. Neste caso, parte-se da equação de energia cinética, considerando que a massa do *Ca. M. multicellularis* é igual à sua densidade (considerou-se a densidade da água: 1 kg/m<sup>3</sup>) multiplicada pelo volume da esfera, conforme demonstrado a seguir:

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 \quad (19)$$

$$m = \rho_c \frac{4}{3}\pi R^3 \quad (20)$$

onde  $v$ ,  $m$ ,  $\rho_c$  e  $R$  são, respectivamente, a velocidade, a massa, a densidade e o raio do *Ca. M. multicellularis*,

Substituindo-se a expressão de  $m$  na primeira equação, chega-se à equação (21), que foi utilizada para calcular a energia cinética de cada microrganismo.

$$E_c = \frac{2\pi}{3} v^2 R^3 \quad (21)$$

Considerando que a energia cinética dos indivíduos tem que se contrapor à energia da agitação térmica, que desorienta o movimento, este valor foi dividido por  $\kappa T$  (energia térmica), assim chegando a um parâmetro adimensional que é, finalmente, o valor utilizado na análise.

Já a análise estatística foi realizada pelo software *Instat*, usando o teste de ANOVA ( $p < 0,05$ ), considerando que os dados estão distribuídos de forma gaussiana.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 VELOCIDADE NOS TRÊS COMPRIMENTOS DE ONDA COM ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### 3.1.1 Experimento I

No primeiro experimento (Tabela 7), para o campo fraco (0,2mT), foi observado que para as iluminações azul e vermelho houve um aumento significativo de velocidade em relação ao controle, já para o verde, não houve diferença substancial com o controle. Ao se aplicar a radiofrequência, verifica-se mudança significativa para todos os comprimentos de onda, exceto o azul, onde houve uma redução muito pequena da velocidade, considerada irrelevante estatisticamente. Percebe-se, neste caso, que a radiofrequência agiu de forma a reduzir as diferenças entre as iluminações, apesar dos valores para o verde terem ultrapassado a média, entretanto saiu do mais devagar para o mais rápido.

Já para o campo forte (2,0mT), observa-se uma tendência diferente: antes da aplicação, a média das velocidades dos *Ca. M. multicellularis* submetidos a iluminação verde foi a única que se destacou, apresentando valor significativamente superior. Após a aplicação da radiofrequência, não houve efeitos significativos para a iluminação verde, entretanto houve aumento para o azul, vermelho, e redução para o controle.

Tabela 7: Valores para velocidade média translacional de retorno dos *Ca. M. multicellularis* no 1º experimento para três comprimentos de onda e o controle (luz do microscópio). Campos de 0,2mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa entre as velocidades sem e com aplicação do RF.

Luz	N	Velocidade média (µm/s)	Desvio Padrão (µm/s)	N	Velocidade média (µm/s)	Desvio Padrão (µm/s)
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
Controle	41	47,3 <sup>A</sup>	11,8	40	68,7 <sup>a</sup> (S)	14,4
Azul (469 nm)	46	73,5 <sup>B</sup>	23,3	40	69,5 <sup>a</sup> (NS)	16,8
Verde (517 nm)	41	52,1 <sup>A</sup>	19,0	46	82,4 <sup>b</sup> (S)	17,8
Vermelho (628 nm)	45	64,6 <sup>B</sup>	15,1	42	73,9 <sup>ab</sup> (S)	13,2
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Controle	40	80,3 <sup>A</sup>	21,0	40	69,3 <sup>a</sup> (S)	19,6
Azul (469 nm)	41	80,2 <sup>A</sup>	33,1	42	113 <sup>b</sup> (S)	27,6
Verde (517 nm)	40	101,8 <sup>B</sup>	24,1	40	97,2 <sup>c</sup> (NS)	27,2
Vermelho (628 nm)	40	86,5 <sup>A</sup>	14,5	40	99,1 <sup>c</sup> (S)	19,4

### 3.1.2 Experimento II

Para o experimento II, os resultados da tabela 8 mostram que, no campo magnético menos intenso (0,2mT), com exceção da luz verde, não há diferenças significativas da velocidade média na comparação entre medidas com e sem aplicação da radiofrequência. Entre as cores, os resultados têm diferenças significativas, sendo mais rápido para o azul, em seguida verde, e mais devagar para o vermelho. Com exceção do azul e verde, essa tendência se manteve após a aplicação da radiofrequência.

No campo magnético de 2,0mT, houve diferença significativa com relação à aplicação da radiofrequência. As velocidades nas diferentes cores mantiveram a tendência do campo fraco, dessa vez também não havendo diferença significativa entre as cores vermelho e verde com ausência de radiofrequência.

Tabela 8: Valores para velocidade média translacional de retorno dos *Ca. M. multicellularis* no 2º experimento para três comprimentos de onda. Campos de 0,2mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa entre as velocidades sem e com aplicação do RF.

Luz	N	Velocidade média (µm/s)	Desvio Padrão (µm/s)	N	Velocidade média (µm/s)	Desvio Padrão (µm/s)
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
Azul (469 nm)	40	99,3 <sup>A</sup>	17,7	40	101,2 <sup>a</sup> (NS)	17,9
Verde (517 nm)	41	88,4 <sup>B</sup>	15,5	40	95,6 <sup>a</sup> (S)	13,0
Vermelho (628 nm)	40	72,5 <sup>C</sup>	17,9	41	79 <sup>b</sup> (NS)	20,8
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Azul (469 nm)	39	125,4 <sup>A</sup>	19,4	41	143,7 <sup>a</sup> (S)	17,4
Verde (517 nm)	40	114,9 <sup>B</sup>	14,2	40	140,6 <sup>a</sup> (S)	12,7
Vermelho (628 nm)	41	106,7 <sup>B</sup>	23,0	46	118,5 <sup>b</sup> (S)	30,2

### 3.1.3 Experimento III

No experimento III, os *Ca. M. multicellularis* apresentaram velocidade superior ao esperado, de forma que impossibilitou a realização da volta em U dentro dos limites do vídeo para o campo de 0,2mT, com resolução de 640x480 pixels. Então ajustou-se o campo para

0,3mT, e a resolução para 800x600, considerando-se também a alteração do valor da radiofrequência aplicada para 8,4 MHz, e a taxa de frames por segundo em 54,2 fps.

No campo magnético de intensidade 0,2mT, não houve diferença estatística entre as cores na ausência de radiofrequência em comparação com a presença. Entretanto, observa-se a tendência geral de aumento da velocidade para a aplicação da radiofrequência. No campo de 2,0mT, os *Ca. M. multicellularis* submetidos ao comprimento de onda vermelho se destacam como o mais rápido. Após a aplicação da radiofrequência, a iluminação azul é a única que tende a reduzir significativamente o valor da velocidade.

Tabela 9: Valores para velocidade média translacional de retorno dos *Ca. M. multicellularis* no 3º experimento para três comprimentos de onda. Campos de 0,3mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa entre as velocidades sem e com aplicação do RF.

Luz	N	Velocidade média (µm/s)	Desvio Padrão (µm/s)	N	Velocidade média (µm/s)	Desvio Padrão (µm/s)
<b>B<sub>0</sub>=0,3 mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,3 mT; RF = 8,4 MHz</b>		
Azul (469 nm)	41	109,5 <sup>A</sup>	24,6	40	114,5 <sup>a</sup> (NS)	25,2
Verde (517 nm)	41	99,6 <sup>A</sup>	20,8	41	105,1 <sup>ab</sup> (NS)	27,4
Vermelho (628 nm)	40	103,8 <sup>A</sup>	20,4	42	102,1 <sup>b</sup> (NS)	16,4
<b>B<sub>0</sub>=2,0 mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0 mT; RF = 56,0 MHz</b>		
Azul (469 nm)	43	138,2 <sup>A</sup>	20,0	42	116,3 <sup>a</sup> (S)	17,7
Verde (517 nm)	41	128,5 <sup>A</sup>	21,7	41	111,3 <sup>a</sup> (S)	16,4
Vermelho (628 nm)	41	152,4 <sup>B</sup>	21,9	40	150,2 <sup>b</sup> (NS)	17,0

## 3.2 ENERGIA CINÉTICA NOS TRÊS COMPRIMENTOS DE ONDA COM ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 3.2.1 Experimento I

A comparação dos valores relativos de energia cinética (Tabela 10) demonstra certa similaridade com os de velocidade, porém reduziu a diferença entre os *Ca. M. multicellularis* submetidos às luzes controle, verde e vermelha (estatisticamente igual ao verde desta vez), havendo maior destaque para o grupo da luz azul. Quando da aplicação da radiofrequência, a

energia cinética referente à luz azul se iguala às outras, a exceção do verde, que se destaca como maior.

No campo de maior intensidade (2,0mT), entre os organismos submetidos aos diversos comprimentos de onda, os do verde e o azul se destacaram por terem valores de energia cinética significativamente maiores que o vermelho e o controle. Ao se aplicar a radiofrequência, também os sob a luz vermelha elevaram sua energia cinética significativamente. O controle permanece estatisticamente distante das outras luzes, com ou sem radiofrequência.

Tabela 10: Resultados da média de energia cinética no 1º experimento nos três comprimentos de onda e o controle (luz do microscópio). Campos de 0,2mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa nos valores após a aplicação do RF.

<b>Luz</b>	<b>N</b>	<b>Energia Cinética/<math>\kappa</math>T</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>N</b>	<b>Energia Cinética/<math>\kappa</math>T</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
<b>Controle</b>	41	0,033 <sup>A</sup>	0,017	40	0,066 <sup>a</sup> (S)	0,038
<b>Azul (469 nm)</b>	41	0,060 <sup>BC</sup>	0,035	40	0,066 <sup>a</sup> (NS)	0,041
<b>Verde (517 nm)</b>	37	0,036 <sup>AC</sup>	0,025	46	0,115 <sup>b</sup> (S)	0,060
<b>Vermelho (628 nm)</b>	45	0,050 <sup>C</sup>	0,026	42	0,072 <sup>a</sup> (S)	0,029
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
<b>Controle</b>	40	0,088 <sup>A</sup>	0,050	40	0,070 <sup>a</sup> (NS)	0,044
<b>Azul (469 nm)</b>	35	0,119 <sup>A</sup>	0,082	42	0,191 <sup>b</sup> (S)	0,110
<b>Verde (517 nm)</b>	40	0,206 <sup>B</sup>	0,115	40	0,195 <sup>b</sup> (NS)	0,100
<b>Vermelho (628 nm)</b>	37	0,098 <sup>A</sup>	0,036	40	0,140 <sup>c</sup> (S)	0,078

### 3.2.2 Experimento II

Os valores de energia cinética no segundo experimento, conforme a tabela 11, mostram que, sob a luz azul, os organismos tiveram maior velocidade, seguindo da luz verde, por último a luz vermelha. Ao campo magnético “forte” (2,0mT), a tendência se mantém igual. O resultado não evidencia diferenças significativas para aplicação da radiofrequência na ocasião do campo magnético “fraco” (0,2mT). Entretanto, na ocasião do campo forte, houve diferença para o azul e o verde, aumentando significativamente os valores nos dois casos.

Tabela 11: Resultados da média de energia cinética no 2º experimento nos três comprimentos de onda. Campos de 0,2mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa nos valores após a aplicação da RF.

	N	Energia Cinética/ $\kappa T$	Desvio Padrão	N	Energia Cinética/ $\kappa T$	Desvio Padrão
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
Azul (469 nm)	40	0,209 <sup>A</sup>	0,101	40	0,208 <sup>a</sup> (NS)	0,118
Verde (517 nm)	41	0,184 <sup>A</sup>	0,111	40	0,224 <sup>a</sup> (NS)	0,101
Vermelho (628 nm)	40	0,102 <sup>B</sup>	0,061	41	0,139 <sup>b</sup> (NS)	0,101
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Azul (469 nm)	39	0,331 <sup>A</sup>	0,190	41	0,520 <sup>a</sup> (S)	0,271
Verde (517 nm)	40	0,305 <sup>B</sup>	0,131	40	0,447 <sup>a</sup> (S)	0,156
Vermelho (628 nm)	41	0,245 <sup>B</sup>	0,134	46	0,292 <sup>b</sup> (NS)	0,204

### 3.2.3 Experimento III

No terceiro experimento (Tabela 12), os valores de energia cinética foram elevados, sendo os menores para a cor verde, depois vermelho, finalmente azul, independente da aplicação da radiofrequência ou não. Já no campo magnético mais intenso, a energia cinética do vermelho mostrou-se relevantemente superior.

Tabela 12: Resultados da média de energia cinética no 3º experimento nos três comprimentos de onda. Campos de 0,3mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa nos valores após a aplicação da RF.

Luz	N	Energia Cinética/ $\kappa T$	Desvio Padrão	N	Energia Cinética/ $\kappa T$	Desvio Padrão
<b>B<sub>0</sub> = 0,3mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,3mT; RF = 8,4MHz</b>		
Azul (469 nm)	41	0,490 <sup>A</sup>	0,263	40	0,474 <sup>a</sup> (NS)	0,337
Verde (517 nm)	41	0,301 <sup>B</sup>	0,240	41	0,329 <sup>b</sup> (NS)	0,228
Vermelho (628 nm)	40	0,362 <sup>AB</sup>	0,238	42	0,372 <sup>ab</sup> (NS)	0,183
<b>B<sub>0</sub> = 2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Azul (469 nm)	43	0,476 <sup>A</sup>	0,228	42	0,464 <sup>a</sup> (NS)	0,220
Verde (517 nm)	41	0,444 <sup>A</sup>	0,199	41	0,353 <sup>b</sup> (S)	0,148
Vermelho (628 nm)	41	0,898 <sup>B</sup>	0,412	40	0,667 <sup>c</sup> (S)	0,246

### 3.3 TEMPO DA VOLTA EM U E MOMENTO MAGNÉTICO

#### 3.3.1 Experimento I

Verifica-se através da tabela 13 que, em comparação ao controle, o tempo da Volta em U para este primeiro experimento aumentou significativamente para todas as luzes, à exceção do vermelho, que manteve um patamar estatisticamente igual. Para os valores obtidos de momento magnéticos (Tabela 14), a partir do tempo da volta em U e raio do *Ca. M. multicellularis*, verifica-se a eliminação da diferença estatística que havia entre a luz vermelha e as luzes verde e azul, havendo destaque para o controle desta vez. Após a aplicação da radiofrequência, o tempo da volta em U dos organismos iluminados pela luz azul se destaca maior que os outros, sendo o único estatisticamente diferente. Analisando o momento para este quesito, se nota o mesmo destaque para a luz azul, dessa vez sendo o menor momento magnético entre as médias.

Em relação ao campo magnético mais intenso (2,0mT), não foram detectadas diferenças significativas entre as médias de tempo da volta em U e momento magnético obtidas, independentemente da aplicação da radiofrequência.

Tabela 13: Valores da média de tempos da volta em “U” 1º experimento nos três comprimentos de onda e o controle (luz do microscópio). Campos magnéticos de 0,2mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. Ao campo de 2,0mT não foram observadas variação estatisticamente significativa entre os valores antes e após a aplicação da RF. Ao campo magnético de 2,0mT, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os tipos de iluminação ou para presença da RF.

Luz	N	Tempo (s)	Desvio Padrão (s)	N	Tempo (s)	Desvio Padrão (s)
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
Controle	40	0,327 <sup>A</sup>	0,106	40	0,372 <sup>a</sup>	0,139
Azul (469 nm)	46	0,575 <sup>B</sup>	0,229	40	0,632 <sup>b</sup>	0,396
Verde (517 nm)	41	0,517 <sup>B</sup>	0,226	46	0,469 <sup>a</sup>	0,198
Vermelho (628 nm)	42	0,402 <sup>C</sup>	0,140	42	0,380 <sup>a</sup>	0,157
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Controle	40	0,135	0,063	40	0,128	0,053
Azul (469 nm)	41	0,137	0,059	42	0,128	0,039
Verde (517 nm)	40	0,139	0,045	40	0,148	0,059
Vermelho (628 nm)	40	0,110	0,036	40	0,125	0,034

Tabela 14: Resultados da média de momentos magnéticos do 1º experimento nos três comprimentos de onda e o controle (luz do microscópio). Campos magnéticos de 0,2mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa nos valores após a aplicação da RF. Ao campo de 2,0mT, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os tipos de iluminação ou para presença da RF.

Luz	N	Momento Magnético ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )	Desvio Padrão ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )	N	Momento Magnético ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )	Desvio Padrão ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
Controle	40	54,6 <sup>A</sup>	28,2	40	45,2 <sup>a</sup> (NS)	25,4
Azul (469 nm)	46	28,0 <sup>B</sup>	15,7	40	28,1 <sup>b</sup> (NS)	14,2
Verde (517 nm)	41	36,7 <sup>B</sup>	19,9	46	44,3 <sup>a</sup> (NS)	22,7
Vermelho (628 nm)	42	34,7 <sup>B</sup>	13,1	42	45,7 <sup>a</sup> (S)	23,3
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Controle	40	27,8	15,6	40	31,6	17,8
Azul (469 nm)	41	36,8	24,1	42	29,4	13,7
Verde (517 nm)	40	37,8	20,1	40	35,7	12,6
Vermelho (628 nm)	40	32,5	15,3	40	29,9	12,3

### 3.3.2 Experimento II

Desta vez, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores do tempo da Volta em U (Tabela 15), tampouco do momento magnético (Tabela 16) para os *Ca. M. multicellularis* submetidos a diferentes comprimentos de onda, tampouco para a aplicação da radiofrequência.

Tabela 15: Valores da média de tempos da volta em “U” 2º experimento nos três comprimentos de onda. Campos de 0,2mT e 2,0mT. Nas quatro situações, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os tipos de iluminação ou para presença da RF.

Luz	N	Tempo (s)	Desvio Padrão (s)	N	Tempo (s)	Desvio Padrão (s)
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
Azul (469 nm)	40	0,365	0,091	40	0,353	0,136
Verde (517 nm)	41	0,350	0,119	40	0,357	0,097
Vermelho (628 nm)	40	0,351	0,111	41	0,368	0,137
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Azul (469 nm)	39	0,111	0,032	41	0,107	0,026
Verde (517 nm)	40	0,111	0,028	40	0,105	0,027
Vermelho (628 nm)	41	0,104	0,025	46	0,105	0,037

Tabela 16: Valores da média de momentos magnéticos 2º experimento nos três comprimentos de onda. Campos de 0,2mT e 2,0mT. Nas quatro situações, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre os tipos de iluminação ou para presença da RF.

Luz	N	Momento Magnético ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )	Desvio Padrão ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )	N	Momento Magnético ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )	Desvio Padrão ( $10^{-15}$ A.m <sup>2</sup> )
<b>B<sub>0</sub>=0,2mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,2mT; RF = 5,6MHz</b>		
Azul (469nm)	40	67,5	28,7	40	67,8	33,7
Verde (517nm)	41	77,8	40,9	40	79,5	30,9
Vermelho (628nm)	40	64,2	32,8	41	74,1	43,6
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Azul (469nm)	39	52,6	31,5	41	65,3	34,9
Verde (517nm)	40	57,9	24,2	40	61,1	23,8
Vermelho (628nm)	41	56,9	26,7	46	55,3	33,2

### 3.3.3 Experimento III

As tabelas Tabela 17 e Tabela 18 mostram que, ao campo magnético de 0,3mT, não temos diferenças significativas para o tempo da volta em U, independentemente da presença de radiofrequência. Houve diferença estatisticamente significativa nos valores de momentos magnéticos para os *Ca. M. multicellularis* submetidos à iluminação azul, em comparação com a vermelha e verde (que permaneceram similares). Essa diferença foi eliminada após a aplicação da radiofrequência. Para o campo de 2,0mT, somente a luz verde com radiofrequência mostra diferença em comparação a vermelha, mas não para a azul. Ao analisar os valores de momento magnético sob este campo, se observa um destaque para o caso da luz vermelha, que é eliminado após a inclusão da radiofrequência.

Tabela 17: Valores da média de tempos da volta em “U” no 3º experimento nos três comprimentos de onda. Campos de 0,3mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. Ao campo magnético de 0,2mT, não houve diferenças estatisticamente significativas dos valores na comparação entre os tipos de iluminação ou para presença da RF, em 2,0mT diferenças somente para iluminação com a presença de RF.

Luz	N	Tempo (s)	Desvio Padrão (s)	N	Tempo (s)	Desvio Padrão (s)
<b>B<sub>0</sub>=0,3mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,3mT; RF = 8,4MHz</b>		
Azul (469 nm)	41	0,432	0,179	40	0,447	0,154
Verde (517 nm)	41	0,448	0,173	41	0,437	0,194
Vermelho (628 nm)	40	0,523	0,201	42	0,491	0,191
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Azul (469 nm)	43	0,156 <sup>A</sup>	0,059	42	0,172 <sup>ab</sup>	0,057
Verde (517 nm)	41	0,164 <sup>A</sup>	0,067	41	0,148 <sup>b</sup>	0,040
Vermelho (628 nm)	41	0,173 <sup>A</sup>	0,065	40	0,196 <sup>a</sup>	0,056

Tabela 18: Valores da média de momentos magnéticos no 3º experimento nos três comprimentos de onda. Campos de 0,3mT e 2,0mT. Letras maiúsculas usadas para comparação entre os resultados sem aplicação da radiofrequência magnética (RF), letras minúsculas para comparação entre os resultados com RF. (S) e (NS) indicam, respectivamente, se houve, ou não, variação estatisticamente significativa nos valores após a aplicação da RF.

Luz	N	Momento Magnético (10 <sup>-15</sup> A.m <sup>2</sup> )	Desvio Padrão (10 <sup>-15</sup> A.m <sup>2</sup> )	N	Momento Magnético (10 <sup>-15</sup> A.m <sup>2</sup> )	Desvio Padrão (10 <sup>-15</sup> A.m <sup>2</sup> )
<b>B<sub>0</sub>=0,3mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=0,3mT; RF = 8,4MHz</b>		
Azul (469nm)	41	83,0 <sup>A</sup>	44,3	40	68,9 <sup>a</sup>	38,4
Verde (517nm)	41	58,8 <sup>B</sup>	41,1	41	61,7 <sup>a</sup>	36,3
Vermelho (628nm)	40	55,5 <sup>B</sup>	35,8	42	67,5 <sup>a</sup>	37,6
<b>B<sub>0</sub>=2,0mT</b>				<b>B<sub>0</sub>=2,0mT; RF = 56,0MHz</b>		
Azul (469nm)	43	46,9 <sup>A</sup>	24,9	42	57,8 <sup>a</sup> (NS)	30,1
Verde (517nm)	41	51,5 <sup>A</sup>	32,5	41	53,8 <sup>ab</sup> (NS)	23,8
Vermelho (628nm)	41	68,7 <sup>B</sup>	38,1	40	42,2 <sup>b</sup> (S)	19,8

## CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 VELOCIDADE E ENERGIA CINÉTICA

A diferença nas velocidades dos *Ca. M. multicellularis* sob iluminação de comprimentos de onda diversos já foram estudadas em outros trabalhos [18], [39], [40]. No experimento I, em relação ao campo magnético de intensidade 0,2mT, a velocidade dos microrganismos submetidos à iluminação azul se destacou, mostrando-se superior em módulo ao vermelho e verde, sendo este último o mais devagar. Após a aplicação da radiofrequência, essa sequência se inverteu, tornando-se crescente do azul para o verde. Esses resultados concordam em parte com trabalhos anteriores, em particular, a constatação da não alteração da velocidade translacional sob a luz azul quando da aplicação da radiofrequência, e da média de velocidade dos *Ca. M. multicellularis* sob a luz monocromática verde (517nm) ser menor que no vermelho e azul, elevando-se com a presença do campo magnético oscilante na frequência de ressonância Zeeman. Já a energia cinética, que leva em consideração a dimensão dos indivíduos (raio,  $R$ ), mostrou uma atenuação nas diferenças, mantendo as células sob iluminação azul em valores superiores. Ao campo magnético de 2,0mT, seria esperado poucas diferenças entre as velocidades, conforme resultados anteriores [40], porém vemos que houve significativas alterações na velocidade média de *Ca. M. multicellularis* nas circunstâncias estabelecidas.

Os experimentos posteriores (II e III) mostram uma tendência de redução nas diferenças entre as médias de velocidade, aumento ou manutenção dos valores (comparação estatística) após a aplicação da radiofrequência, e tendência de que *Ca. M. multicellularis* sob a luz vermelha significativamente mais devagar que sob a luz azul. Esta última constatação é a mais divergente dos resultados anteriores, entretanto no trabalho de Acosta-Avalos de 2015 [39], é evidenciado que a média de velocidade dos microrganismos é uma função complexa do campo magnético e da irradiância de luz. A exemplo disso, percebe-se que os valores no campo magnético 2mT não seguem a tendência do campo magnético mais fraco.

O valor da potência de luz utilizada neste trabalho ( $\sim 125\mu\text{W}$ ), assim com as intensidades de campo magnético (0,2 e 2,0mT) são levemente diferentes dos utilizados nos trabalhos anteriores citados, e há de se levar em consideração que os organismos foram coletados em seu ambiente natural, o que pode significar alterações na estrutura e fisiologia do *Ca. M. multicellularis*, conforme mudanças no ecossistema provocadas pelo tempo, estações do ano, período de chuvas etc., o que limita nossa capacidade de comparação com outros resultados.

Já foi observado que a velocidade do *Ca. M. multicellularis* é uma função complexa da intensidade do campo magnético e da irradiância da luz [39]. No presente estudo, as velocidades no geral foram maiores para o campo magnético mais intenso (2,0mT). Almeida et al. [42] estudaram o movimento do *Ca. M. multicellularis* para campos magnéticos com intensidades de 0,39mT e 2,0mT, e analisaram as trajetórias como hélices cilíndricas, observando que a velocidade axial aumenta significativamente quando o campo magnético aumenta (de 87µm/s para 110µm/s). De Melo e Acosta-Avalos [40] também analisaram o movimento do *Ca. M. multicellularis* e mediram a velocidade média de deslocamento para dois campos magnéticos diferentes (0,16mT e 2,66mT), também constando que a velocidade aumenta quando o campo magnético aumenta: aproximadamente de 94µm/s para 110µm/s. Nos nossos três experimentos, foi observado o mesmo fenômeno: velocidade aumentando de aproximadamente 69µm/s para 82µm/s no experimento I (campos magnéticos 0,2mT e 2,0mT), de aproximadamente 90µm/s para 110µm/s no experimento II (campos magnéticos conforme experimento I), e de aproximadamente 104µm/s para 133µm/s no experimento III (campos magnéticos de 0,3mT e 2,0mT). Este aumento de velocidade não é esperado para organismos magnetotáticos em geral, pois a magnetotaxia somente deveria mudar a orientação de nado relativa ao campo magnético, e não a velocidade.

Ao se calcular a energia cinética, leva-se em conta o valor do raio do microrganismo, elevado à terceira potência, o que torna a análise mais completa, inclusive porque o tamanho do *Ca. M. multicellularis* tem relação direta de proporcionalidade com o valor do momento magnético, afetando a magnetossensibilidade. Pela diferença que temos de tamanhos entre o primeiro e o último experimentos, é interessante considerar esta interpretação. Inclusive, através do gráfico abaixo (Figura 11), é notável o aumento da velocidade em concordância direta com o raio dos microrganismos.

Ainda não há na literatura informações sobre estudos nesse sentido com dados de energia cinética, então é difícil estipular o que era esperado para os valores do quociente “energia cinética/energia térmica”. É possível perceber que o movimento de translação na direção do campo magnético, em relação ao valor de energia térmica, teve uma relação mínima de 3,3% (experimento I, controle, sem RF) e máxima de 89,8% (experimento III, controle, com RF).

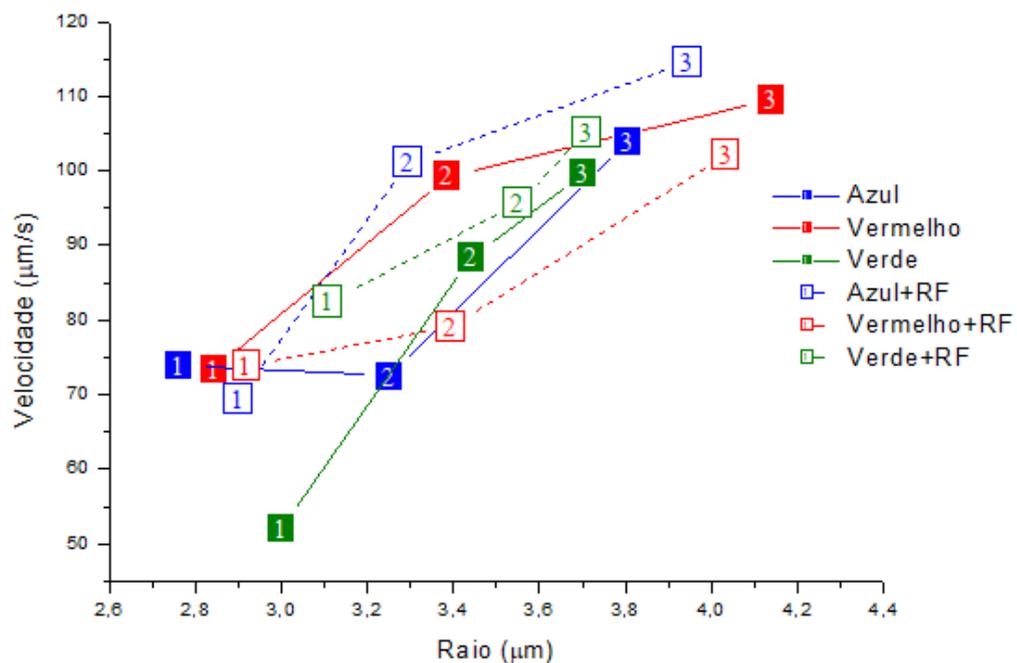


Figura 11: Gráfico da correlação entre velocidade e raio nos 3 experimentos, com o campo externo de 0,3mT, para os de índice 3, e 0,2 mT para o restante.

## 4.2 TEMPO DA VOLTA EM U E MOMENTO MAGNÉTICO

Os tempos de volta em U obtidos no primeiro experimento não seguem o padrão dos resultados obtidos no trabalho de Azevedo et al. [18]. Além dos valores terem sido reduzidos à aproximadamente metade na média, os tempos para execução da volta em U são crescentes da luz vermelha, seguida da luz verde, para a azul (no caso daquele trabalho, o tempo crescia do verde para o vermelho). Após a ativação da radiofrequência, os valores não mudam significativamente. Fica claro a influência do comprimento de onda na percepção do campo magnético somente para as luzes verde e vermelha.

Entretanto, nos experimentos seguintes, assim como ao se aumentar a intensidade do campo magnético para 2,0mT, praticamente não se observam diferenças significativas na média dos tempos de execução da volta em U. Assim, não foi constatada repetição do ocorrido no primeiro experimento.

Em relação ao trabalho de Azevedo et al. [18], há de se considerar que, também neste caso, além da origem dos *Ca. M. multicellularis* ser de ambiente “não controlado” (que pode

alterar aspectos do organismo), os procedimentos experimentais divergem quanto aos valores de intensidade de campo magnético e potência da luz incidente, além do método utilizado para o cálculo do tempo da volta em U naquele trabalho também ser diferente.

Quando se analisa o momento magnético, extrai-se a hipótese de que a diminuição das diferenças entre os valores pode ser efeito do aumento do raio dos organismos, parâmetro que, a princípio, não estaria sofrendo influência dos fatores experimentais (intensidade de campo magnético e iluminação). É possível verificar que os valores dos momentos magnéticos cresceram do primeiro para o último experimento, o que pode estar relacionado ao aumento nas dimensões do *Ca. M. multicellularis* (que contribuem com a terceira potência para o valor de  $m$ , conforme equação (18)), assim como a diminuição do tempo da volta em U, que poderia alcançar os limites de precisão para a técnica utilizada nas análises e da taxa de reprodução (fps) dos vídeos.

Em seu ciclo de vida, há a fase em que o organismo aumenta de tamanho mantendo o número de células constante, até o momento em que dobra de tamanho (mantendo  $a = 0$ , na equação (1)). Suspeita-se que esse fato possa afetar algumas propriedades do organismo, especialmente a fase da divisão celular, em que há uma distribuição de magnetossomos e flagelos entre as células divididas [29], o que pode interferir no momento magnético total, visto que este depende da configuração magnética de disposição dos dipolos [30].

Sabendo-se que o organismo dobra de volume no início da sua reprodução, a razão entre os raios de organismo prestes a se reproduzir (se dividir) e outro organismo recém-formado, é igual a:

$$\frac{4}{3}\pi R^3 = 2\frac{4}{3}\pi r^3 \quad (22)$$

$$\frac{R}{r} = \sqrt[3]{2} = 1,259921$$

onde  $R$  é o raio do *Ca. M. multicellularis* prestes a se reproduzir (dobro do volume) e  $r$  o raio do *Ca. M. multicellularis* jovem. Dividindo-se a média dos raios dos microrganismos do último experimento com os do primeiro, os valores resultantes são muito próximos de  $\sqrt[3]{2}$  (Tabela 19), fato que induz a ideia de que os *Ca. M. multicellularis* poderiam realmente estar em momentos diferentes do seu ciclo de vida.

Tabela 19: Média dos raios dos *Ca. M. multicellularis* em cada experimento, ao final, a razão entre as medidas III/I e II/I.

Experimento	Média dos Raios ( $\mu\text{m}$ )
I	2,99
II	3,40
III	3,86
III / I	1,29
II/I	1,14

É possível também que a contribuição devida ao aumento de tamanho esteja influenciando outros fatores além do tempo da volta, considerando o estágio particular do ciclo de vida do *Ca. M. multicellularis*. Na figura 12, temos um exemplo do aumento do momento magnético conforme crescimento do raio dos microrganismos.

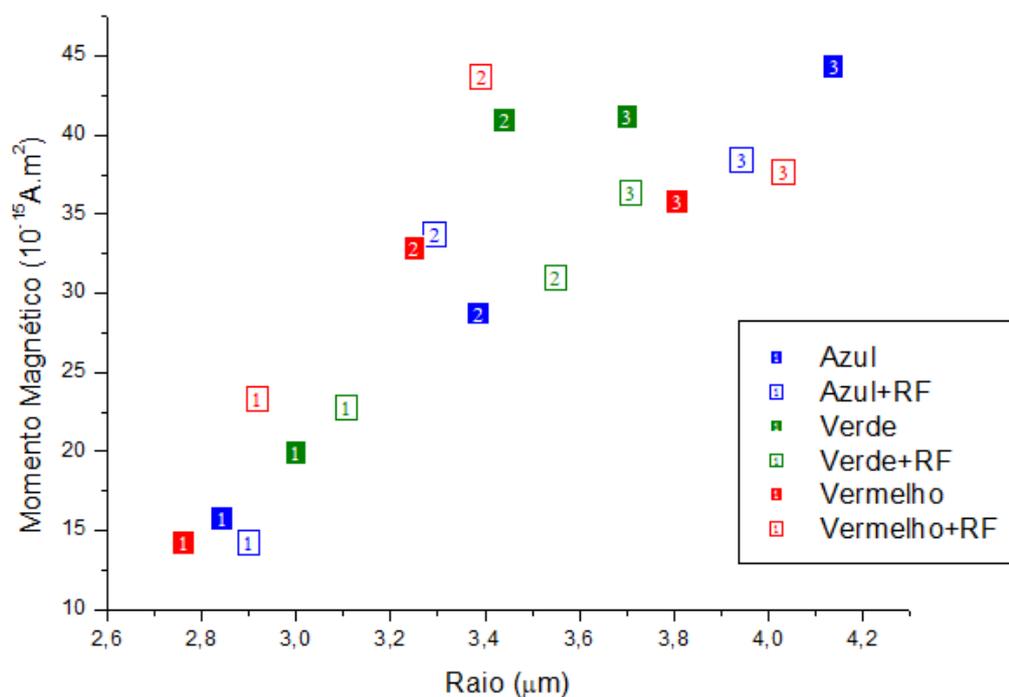


Figura 12: Gráfico da correlação entre o Raio e Momento Magnético para os três experimentos ao campo de 0,2mT (experimento III a 0,3mT).

O campo magnético em radiofrequência, que aplicado com a intenção de anular possíveis efeitos de pares radicais, mostrou significativa interferência nas velocidades calculadas, em especial do primeiro experimento. Já para o tempo da volta em U, não mostrou

influência e essa tendência se manteve nos três experimentos. Então a suspeita de um fotorreceptor baseado em mecanismo de Pares Radicais atuante na magnetossensibilidade do *Ca. M. multicellularis* foi descartada por essa técnica. Analisando os valores de momentos magnéticos dos organismos, também se chega a mesma conclusão.

Na literatura há relatos de que aumento da magnetossensibilidade de moscas *Drosophila melanogaster* para comprimentos de onda menores que 420nm, a um campo magnético de 5G [43]. Naquele caso, a magnetossensibilidade foi atribuída a presença da proteína fotorreceptora criptocromo (Cry). No presente trabalho, não foi utilizada luz monocromática com comprimento de onda menor que 469nm e, para a luz do microscópio (lâmpada de halogênio), que, em seu espectro total, contém comprimentos de onda de valor menor que 420nm (ainda que em relativamente baixa intensidade), quando comparados com a situação da luz monocromática (azul, verde e vermelho), foi observada significativa redução na média dos valores de tempos da volta em U (Tabela 13) e aumento nos valores de momentos magnéticos (Tabela 14), concordando parcialmente com o resultado do trabalho com as *D. melanogaster*. Em futuros experimentos, é importante o uso de fontes de luz monocromática com comprimento de onda menor que 420nm para avaliar a participação de criptocromos na magnetossensibilidade de *Ca. M. multicellularis*.

Por fim, percebeu-se uma diminuição dos valores de momento magnético dos *Ca. M. multicellularis* do campo magnético fraco (0,2 e 0,3mT) para o campo magnético forte (2,0 mT). Essa diminuição não é necessariamente real, pois não é esperado que o momento magnético do *Ca. M. multicellularis* mude em função do campo magnético aplicado. O momento magnético foi calculado usando a técnica da volta em U, e este modelo matemático em que está baseada assume que somente dois torques estão agindo durante a volta: o torque magnético e o torque hidrodinâmico (Equação 9). Porém, a curva da volta em U mostra ondulações de tal forma que não pode ser explicada suficientemente pelos dois torques mencionados (vide Figura 2). Pichel et al. [44] estudaram as voltas em U do espirilo magnetotático *Magnetospirillum gryphiswaldense* e observaram que para modelar as ondulações na curva da volta em U é necessário somar um torque sinusoidal causado pelo movimento flagelar, de tal forma que: (Torque Magnético) + (Torque Hidrodinâmico) + (Torque Flagelar) = 0. No mesmo sentido, Zhu et al. [45], estudando o movimento da bactéria *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1, observaram que a proteína Amb0994 está relacionada, de alguma forma, com a transmissão da informação para os flagelos do ângulo entre a cadeia de magnetossomos e o campo magnético, definindo o que eles chamam de

“detecção do ângulo” ou *angle sensing*. Assim, Zhu et al. [45] observaram que para campos magnéticos baixos ( $<3\text{mT}$ ) o torque flagelar tem uma contribuição importante, e para campos magnéticos altos ( $>3\text{mT}$ ), somente o torque magnético é importante. Todas estas observações podem explicar por que o momento magnético do *Ca. M. multicellularis* aparentemente aumenta de  $0,2\text{mT}$  para  $2,0\text{mT}$ : a nossa interpretação do tempo da volta em U para campos magnéticos baixos ( $0,2\text{mT}$ ) deveria incluir a influência do movimento flagelar, de tal forma a corrigir as variações observadas nos nossos experimentos. Contudo, o *Ca. M. multicellularis* é um microrganismo com muitos flagelos curtos distribuídos ao redor do seu corpo. Isto dificulta a modelagem do movimento, pois a influência dos flagelos não é simples de modelar neste caso. Para entender melhor este fenômeno observado, uma perspectiva futura de pesquisa é a modelagem numérica das voltas em U, incluindo o movimento dos flagelos do *Ca. M. multicellularis*, para calcular o tempo da volta U para vários campos magnéticos e assim entender melhor a contribuição do movimento flagelar na volta em U.

## CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos experimentos da presente dissertação conseguiu mostrar a influência da iluminação e da intensidade do campo magnético no movimento e na percepção do campo magnético pelos *Ca. M. multicellularis*. Entretanto, isto ficou mais evidente no primeiro experimento, nos seguintes os organismos estavam maiores e isto provavelmente modificou os resultados.

Os resultados mostraram dois fenômenos interessantes: o aumento da velocidade e a diminuição do momento magnético do *Ca. M. multicellularis* com o aumento do campo magnético. Isto significa que ainda existem características não compreendidas sobre interação do campo magnético com os microrganismos magnetotáticos. Nossos modelos para a volta em U têm de ser revisados de tal forma que incluam o efeito do movimento flagelar, e uma melhor análise de como uma distribuição de momentos magnéticos interage com um campo magnético externo deve permitir entender melhor porque a velocidade aumenta com a intensidade do campo magnético. Estudos teóricos futuros devem melhorar nossa compreensão sobre estes fenômenos.

Em particular, o primeiro experimento foi realizado em duas fases: luzes azul e verde em outubro de 2017; vermelha e controle em janeiro de 2018. Isto aconteceu devido a problemas técnicos. Contudo, este fato não compromete a discussão e conclusões finais sobre as informações extraídas dos dados experimentais.

O ciclo de vida dos *Ca. M. multicellularis* já é bem conhecido e foi devidamente descrito neste trabalho (1.3), porém os fatores que interferem ou determinam as fases deste ciclo ainda não estão resolvidos na literatura. Entre as possíveis causas do aumento nas dimensões dos organismos no decorrer de vários experimentos, podemos supor as fases diferentes do ciclo de vida ou, além disso, organismos geneticamente diferentes. A hipótese de os organismos estarem em momentos diferentes do ciclo de vida, e que esta seja a causa da diferença de tamanhos, induz à conclusão de que o fator externo que estaria estimulando essa etapa do desenvolvimento do *Ca. M. multicellularis* (reprodução) foi comum a todos os microrganismos. Estações do ano, período de chuvas, dia, local e horário da coleta representam situações que poderiam estar relacionadas a este estímulo. Destaque-se que os experimentos foram realizados durante o período do final da tarde/início da noite, o que poderia significar alguma sincronia com a hora do dia para iniciar o processo de divisão. Em trabalho publicado em 2013 por Abreu

et al.[46], verificou-se que, durante a noite, o número de microrganismos coletados em processo de divisão era maior, sugerindo que o ciclo de vida multicelular poderia estar sob controle do ritmo circadiano. Essas questões podem fundamentar pesquisas futuras e produzir novas informações sobre *Ca. M. multicellularis* e outros microrganismos com propriedades semelhantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Bellini, “Su di un particolare comportamento di batteri d’acqua dolce (On a unique behavior of freshwater bacteria)”, *Ist. Di Mickobiologia Dell’Università Di Pavia*, 1963.
- [2] R. Blakemore, “Magnetotactic bacteria”, *Science (80-. )*, vol. 190, n° 4212, p. 377–379, out. 1975.
- [3] D. S. McKay *et al.*, “Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH84001”, *Science (80-. )*, vol. 273, n° 5277, p. 924–930, 1996.
- [4] B. R. Tortora, Gerard J.; Case, Christine L.; Funke, *Microbiologia*, 12° ed. Pearson Education, Inc., 2017.
- [5] R. B. Frankel, R. P. Blakemore, e R. S. Wolfe, “Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria”, *Science (80-. )*, vol. 203, n° 4387, p. 1355–1356, 1979.
- [6] K. H. Schleifer *et al.*, “The Genus *Magnetospirillum* gen. nov. Description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and Transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov.”, *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 14, n° 4, p. 379–385, out. 1991.
- [7] F. C. Meldrum, S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel, e D. A. Bazylinski, “Electron microscopy study of magnetosomes in a cultured coccoid magnetotactic bacterium”, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 251, n° 1332, p. 231–236, 1993.
- [8] A. M. Spormann e R. S. Wolfe, “Chemotactic, magnetotactic and tactile behaviour in a magnetic spirillum”, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 22, n° 3, p. 171–177, 1984.
- [9] R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, M. S. Johnson, e B. L. Taylor, “Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria”, *Biophys. J.*, vol. 73, n° 2, p. 994–1000, 1997.
- [10] R. Blakemore, R. Frankel, e A. Kalmijn, “South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern Hemisphere”, *Nature*, vol. 286, n° 8771, p. 384–385, 1980.
- [11] E. F. Kneller e F. E. Luborsky, “Particle size dependence of coercivity and remanence of single-domain particles”, *J. Appl. Phys.*, vol. 34, n° 3, p. 656–658, 1963.
- [12] J. Frenkel e J. Dorfman, “Spontaneous and induced magnetisation in ferromagnetic bodies”, *Nature*, vol. 126, n° 3173, p. 274–275, 1930.
- [13] R. B. Frankel, “Biological Permanent Magnets”, *Hyperfine Interact.*, vol. 151, n° 1–4, p. 145–153, 2003.
- [14] M. Farina, H. G. P. Lins de Barros, D. M. S. Esquivel, e J. Danon, “Ultrastructure of a magnetotactic microorganism”, *Biol. Cell.*, vol. 48, n° 1, p. 85–88, 1980.
- [15] F. G. Rodgers *et al.*, “Intercellular structure in a many-celled magnetotactic prokaryote”, *Arch. Microbiol.*, vol. 154, n° 1, p. 18–22, 1990.
- [16] F. Abreu *et al.*, “‘Candidatus magnetoglobus multicellularis’, a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 57, n° 6, p. 1318–1322, 2007.
- [17] C. N. Keim, F. Abreu, U. Lins, H. L. De Barros, e M. Farina, “Cell organization and ultrastructure of a magnetotactic multicellular organism”, *J. Struct. Biol.*, vol. 145, n° 3,

p. 254–262, 2004.

- [18] L. V. De Azevedo, H. L. De Barros, C. N. Keim, e D. Acosta-Avalos, “Effect of light wavelength on motility and magnetic sensibility of the magnetotactic multicellular prokaryote ‘Candidatus Magnetoglobus multicellularis’”, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 104, n° 3, p. 405–412, 2013.
- [19] D. Schüler, *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, vol. 3. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [20] C. N. Keim *et al.*, “Multicellular life cycle of magnetotactic prokaryotes”, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 240, n° 2, p. 203–208, 2004.
- [21] E. F. DeLong, R. B. Frankel, e D. A. Bazylinski, “Multiple evolutionary origins of magnetotaxis in bacteria”, *Science (80-. )*, vol. 259, n° 5096, p. 803–806, 1993.
- [22] S. L. Simmons, S. M. Sievert, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, e K. J. Edwards, “Spatiotemporal distribution of marine magnetotactic bacteria in a seasonally stratified coastal salt pond”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, n° 10, p. 6230–6239, 2004.
- [23] C. N. Keim *et al.*, “Spatial relationships of cells within magnetotactic multicellular aggregates.”, *Acta Microsc.*, vol. 12, n° suppl B, p. 367–368, 2003.
- [24] H. G. P. Lins de Barros, D. M. S. Esquivel, e M. Farina, “Biomineralization of a New Material by a Magnetotactic Microorganism”, in *Iron Biominerals*, 1991, p. 257–268.
- [25] U. Lins e M. Farina, “Organization of cells in magnetotactic multicellular aggregates”, *Microbiol. Res.*, vol. 154, n° 1, p. 9–13, 1999.
- [26] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, A. J. Garratt-Reed, e S. Mann, “Biomineralization of Iron Sulfides in Magnetotactic Bacteria from Sulfidic Environments”, in *Iron Biominerals*, Boston, MA: Springer US, 1991, p. 239–255.
- [27] D. A. Bazylinski, A. J. Garratt-Reed, A. Abedi, e R. B. Frankel, “Copper association with iron sulfide magnetosomes in a magnetotactic bacterium”, *Arch. Microbiol.*, vol. 160, n° 1, p. 35–42, 1993.
- [28] M. Pósfai, P. R. Buseck, D. A. Bazylinski, e R. B. Frankel, “Iron sulfides from magnetotactic bacteria: Structure, composition, and phase transitions”, *Am. Mineral.*, vol. 83, n° 11, p. 1469–1481, 1998.
- [29] C. N. Keim, J. Lopes Martins, H. Lins de Barros, U. Lins, e M. Farina, “Structure, Behavior, Ecology and Diversity of Multicellular Magnetotactic Prokaryotes”, in *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, 2006, p. 103–132.
- [30] D. Acosta-Avalos, L. M. Dos Santos Azevedo, T. S. Andrade, e H. L. De Barros, “Magnetic configuration model for the multicellular magnetotactic prokaryote Candidatus Magnetoglobus multicellularis”, *Eur. Biophys. J.*, vol. 41, n° 5, p. 405–413, 2012.
- [31] A. J. Kalmijn, “Biophysics of geomagnetic field detection”, *IEEE Trans. Magn.*, vol. 17, n° 1, p. 1113–1124, 1981.
- [32] R. B. Frankel e R. P. Blakemore, “Navigational compass in magnetic bacteria”, *J. Magn. Mater.*, vol. 15, n° 3, p. 1562, 1980.
- [33] R. B. Frankel, “Magnetic guidance of organisms.”, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 13,

- n° 1, p. 85–103, 1984.
- [34] D. M. S. Esquivel e H. G. P. Lins de Barros, “Motion of magnetotactic microorganisms”, *J. Exp. Biol.*, vol. 121, n° 1, p. 153–163, 1986.
- [35] I. S. M. Khalil, M. P. Pichel, B. A. Reefman, O. S. Sukas, L. Abelmann, e S. Misra, “Control of magnetotactic bacterium in a micro-fabricated maze”, in *Proceedings - IEEE International Conference on Robotics and Automation*, 2013, p. 5508–5513.
- [36] A. S. Bahaj, P. A. B. James, D. C. Ellwood, e J. H. P. Watson, “Characterization and growth of magnetotactic bacteria: Implications of clean up of environmental pollution”, *J. Appl. Phys.*, vol. 73, n° 10, p. 5394–5396, 1993.
- [37] C. T. Rodgers e P. J. Hore, “Chemical magnetoreception in birds: The radical pair mechanism”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, n° 2, p. 353–360, 2009.
- [38] O. H. Shapiro, R. Hatzepichler, D. H. Buckley, S. H. Zinder, e V. J. Orphan, “Multicellular photo-magnetotactic bacteria”, *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 3, n° 2, p. 233–238, 2011.
- [39] L. V. de Azevedo e D. Acosta-Avalos, “Photokinesis is magnetic field dependent in the multicellular magnetotactic prokaryote *Candidatus Magnetoglobus multicellularis*”, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 108, n° 3, p. 579–585, 2015.
- [40] R. D. de Melo e D. Acosta-Avalos, “Light effects on the multicellular magnetotactic prokaryote ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ are cancelled by radiofrequency fields: the involvement of radical pair mechanisms”, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 110, n° 2, p. 177–186, 2017.
- [41] C. T. Rodgers, “Magnetic field effects in chemical systems”, *Pure Appl. Chem.*, vol. 81, n° 1, p. 19–43, 2009.
- [42] F. P. Almeida, N. B. Viana, U. Lins, M. Farina, e C. N. Keim, “Swimming behaviour of the multicellular magnetotactic prokaryote ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’ under applied magnetic fields and ultraviolet light”, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 103, n° 4, p. 845–857, 2013.
- [43] R. J. Gegear, A. Casselman, S. Waddell, e S. M. Reppert, “Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*”, *Nature*, vol. 454, n° 7207, p. 1014–1018, 2008.
- [44] M. P. Pichel, T. A. G. Hageman, I. S. M. Khalil, A. Manz, e L. Abelmann, “Magnetic response of *Magnetospirillum gryphiswaldense* observed inside a microfluidic channel”, *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 460, p. 340–353, ago. 2018.
- [45] X. Zhu *et al.*, “Angle sensing in magnetotaxis of *Magnetospirillum magneticum* AMB-1”, *Integr. Biol.*, vol. 6, n° 7, p. 706–713, 2014.
- [46] F. Abreu *et al.*, “Deciphering unusual uncultured magnetotactic multicellular prokaryotes through genomics”, *ISME J.*, vol. 8, n° 5, p. 1055–1068, 2014.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Micrografia Eletrônica de Varredura de uma <i>Candidatus Magnetoglobus multicellularis</i> . Escala da barra 2 $\mu\text{m}$ . Fonte: Keim et al (2012).....	5
Figura 2: Amostra de um gráfico obtido com a execução de uma volta em U por um <i>Candidatus Magnetoglobus multicellularis</i> submetido a uma inversão de campo magnético. 12	
Figura 3: Armazenamento e conservação dos microrganismos magnetotáticos. Os sedimentos da Lagoa de Araruama são depositados nos aquários à direita da foto. ....	18
Figura 4. Concentrador de vidro e ímã. ....	19
Figura 5: Coleta do líquido através do bico do concentrador.....	19
Figura 6: Microscópio óptico utilizado como sistema de observação.....	20
Figura 7: Bobina de Helmholtz acoplada à lâmina.....	21
Figura 8: Fonte de alimentação com regulagem de tensão.....	21
Figura 9: Gerador de funções para o campo magnético oscilante.....	21
Figura 10: Gráfico da velocidade de um organismo sujeito à inversão do campo magnético ( $\sim 0.2\text{ mT}$ ). Os pontos escolhidos estão indicados pelas setas. ....	24
Figura 11: Gráfico da correlação entre velocidade e raio nos 3 experimentos, com o campo externo de $0,3\text{mT}$ , para os de índice 3, e $0,2\text{ mT}$ para o restante. ....	38
Figura 12: Gráfico da correlação entre o Raio e Momento Magnético para os três experimentos ao campo de $0,2\text{mT}$ (experimento III a $0,3\text{mT}$ ).....	40