

Tese de Doutorado

Caracterização do material magnético em
antenas de formigas *Pachycondyla*
marginata: um possível sistema
magnetosensor

Jandira Ferreira de Oliveira

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

Rio de Janeiro, março de 2010

Agradecimentos:

- Dra Eliane Wajnberg, Dra Darci M. de Souza Esquivel e Dra. Marianne Hanzlik pela orientação.
- Dr. Michael Winklhofer pelas interessantes discussões e insights sobre o trabalho desenvolvido.
- Dra Sevil Weinkauff por fornecer toda estrutura adequada à realização do trabalho em seus laboratórios.
- Christopher Kaiser , Birgit Seibl, Andreas Kastenmuller, Johannes Buchner, Natalie, Florian, Julia e Francis pelo suporte em atividades relacionadas ao desenvolvimento do trabalho.
- À direção da Mata de Santa Genebra por permitir a coleta dos insetos em estudo.
- A Leandro Talione Sabagh e Dr. Odivaldo Cambraia pela coleta de formigas *Pachycondyla marginata* na Mata de Santa Genebra em Campinas.
- Ao mestre Fernando Almeida, Maria de Lourdes Barriviera e Márcia de Araujo Barbosa pelo auxílio na preparação de amostras.
- A Nivalde Antonio Basso, Maria Helena Moreno e Claudete dos Santos, da UNESP/Botucatu pela introdução prática em Microscopia eletrônica de transmissão
- Ao Major Pinto pela excelente introdução teórica ao curso de microscopia eletrônica de transmissão e varredura no Instituto Militar de Engenharia (IME)
- A Dra. Marcia Attias e aos vários pesquisadores envolvidos pelo curso oferecido (CCS/UFRJ) de Microscopia Eletrônica aplicada a amostras biológicas
- A Roberto Eizemberg dos Santos pelas fotos e vídeos emprestados para divulgação na imprensa.
- A João Carlos Costa dos Anjos, Myriam S. Coutinho, José de Almeida Ricardo, Elizabeth Alves, da CFC, por todo apoio e estrutura oferecidos pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas.
- Àqueles que ajudaram a tornar a estadia na Alemanha mais agradável: Felix Merkel, Marianne Hanzlik, Mário Videira, Mariana Lopes, Katia Andrade, Danusa Colares, Janire Mimentza, Janai Gilmore, Ieva Iazaka, André Loose, Gerrit Ulrichs, Magaly Malet, Jacques Pecreaux, Ute Hahmann, Luis Wong, Dechao Wang, Carol Motta e família e toda a turma de dezembro/06 a março/07 do Instituto Goethe - Dresden.
- À minha família: Dalva Almeida e Daniela Oliveira.
- À amiga: Virginia Torres.

- Ao CNPq e ao convênio CNPq/DAAD/CAPES pelas bolsas, doutorado e doutorado sanduíche, concedidas.

INDICE

Resumo	iii
Abstract	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xv
Introdução	1

Capítulo I - Órgãos sensoriais na antena dos insetos e seu possível uso como magnetoreceptores	3
---	---

Capítulo II - Revisão

1. Orientação e Navegação	19
2. Óxidos de ferro e titânio	21
3. Ressonância Ferromagnética e material magnético em insetos sociais	26
4. Uso da microscopia para identificação de magnetoreceptores	31

Capítulo III – Material e métodos

1. Medidas de Ressonância Ferromagnética	38
2. Extração Magnética	41
3. Preparação de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
4. Preparação de amostras para Microscopias Óptica e Eletrônica de Transmissão (MET)	43
5. Otimização do protocolo de preparação de cortes ultra-finos de antenas de formigas <i>P. marginata</i>	47
6. Reação azul a Prússia/Turnbull e Microscopia Óptica	51
7. Revelação dos filmes fotográficos – Negativos	53
8. Calibração da constante de câmera (CC) e obtenção dos espaçamentos interplanares dos padrões de difração de elétrons	53

Capítulo IV – Resultados e discussão

1. Ressonância Ferromagnética	55
1-i) Medidas do solo	55
1-ii) Diferenças individuais	62

1-iii) Remoção de contaminantes da cutícula de formigas	64
1-iv) Medida das partes do corpo	65
1-v) Variação térmica	69
Microscopia óptica e eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV)	
2. Extração magnética	78
3. Reação azul da Prússia e de Turnbull	82
4. Pelos sensores	86
4-i) Identificação de sensilas	86
4-ii) Partículas contendo ferro nas sensilas	91
5. Cortes ultra-finos de antenas de formiga <i>P. marginata</i>	93
Capítulo V – Considerações finais	101
Referências	106

Resumo

A influência do campo geomagnético em seres vivos vem sendo estudada através de fenômenos naturais, como migração, volta ao lar, etc. Há cerca de três décadas cristais magnéticos foram observados em bactérias magnetotáticas, com a evidência física do fenômeno de magnetotaxia através do alinhamento passivo destas bactérias por um campo magnético (Blakemore 1975). Estudos comportamentais posteriores têm mostrado que o campo magnético terrestre é mais uma fonte de informação do meio ambiente para orientação e navegação de um grande número de animais.

Magnetorecepção em animais é um mecanismo complexo, ainda pouco compreendido, que consiste em detectar o campo geomagnético, transferir a informação recebida para o sistema nervoso, que é levada ao cérebro onde é processada e utilizada para distintos propósitos. Entre as hipóteses e modelos que discutem a natureza dos receptores magnéticos, atualmente, a ferromagnética, que sugere nanopartículas magnéticas biomineralizadas como transdutores da informação, e um compasso químico baseado num par de radicais são as mais discutidas.

A análise da migração de formigas *Pachycondyla marginata*, mostrou uma orientação significativa de um ângulo de 13° com relação ao eixo norte-sul geomagnético. Medidas magnéticas de partes do corpo (antena, cabeça, tórax e abdômen) sugeriram antenas como órgãos magnetoreceptores. Neste trabalho, a verificação deste resultado foi feita através de medidas a temperatura ambiente por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) de indivíduos, partes e conjuntos de indivíduos, além de medidas de variação térmica para caracterização do material magnético presente nas amostras. Medidas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MET e MEV) dos extratos magnéticos obtidos do material medido anteriormente por RPE identificou compostos contendo Al, Si, Fe, O e Ti foram encontrados, porém não se obteve nenhuma indicação da presença de material biomineralizado em qualquer uma das partes. A única maneira possível de se constatar a presença de material biomineralizado em um animal é através da análise destas regiões dentro de tecidos.

Para identificar regiões contendo $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ no tecido antenal, microscopia óptica foi utilizada em tecidos contrastados através da reação do azul da Prússia ou de Turnbull.

Análises posteriores, utilizando microscopia eletrônica de transmissão para imagem e obtenção de padrões de difração de elétrons, combinada com análise elemental, revelaram a presença de grãos cristalinos ultrafinos (20-100 nm) de magnetita/maghemita (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$) além de (alumo)silicatos e compostos de Fe/Ti/O em distintas partes da antena, que são, as junções entre o terceiro segmento e o pedicelo, pedicelo e escapo e escapo e cabeça, respectivamente. A presença de (alumo)silicatos e compostos de Fe/Ti/O sugerem que a maior parte, se não toda, dos minerais encontrados no tecido sejam partículas incorporadas do solo e não biomineralizadas pelas formigas. No entanto, já que as partículas foram observadas dentro de tecidos elas não representam contaminação. A quantidade de material magnético associado ao órgão de Johnston e outras junções parece ser suficiente para produzir um output mecanosensorial modulado pelo campo magnético, que pode portanto ser a base do sensor magnético desta formiga migratória.

Abstract

The influence of the geomagnetic field on the behaviour of living beings has been studied in phenomena like migration, homing, etc. Magnetite crystals were observed in magnetotactic bacteria at about 30 years ago. It was the first physical evidence of a passive mechanism, magnetotaxis, through the alignment of magnetotactic bacteria with a magnetic field (Blakemore 1975). Behavioural studies have shown that the geomagnetic field is also an environmental information used for orientation and navigation by a great number of animals.

Magnetoreception is a complex mechanism, yet poorly understood, that involves the detection of the geomagnetic field and a subsequent transduction of the signal to the nervous system. The information is transferred to a specific brain area and used for different proposals. For magnetoreception, two hypotheses are currently discussed, one proposing a chemical compass based on a radical pair mechanism, the other postulating processes involving magnetite particles, named ferromagnetic hypothesis.

Migration of the *Pachycondyla marginata* ant is significantly oriented at 13° with respect to the geomagnetic north–south axis. On the basis of previous magnetic measurements of individual parts of the body (antennae, head, thorax and abdomen), the antennae were suggested to host a magnetoreceptor. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) measurements on individuals, parts or groups of insects at room temperature and a temperature dependence for the characterization of the magnetic material in the samples were done. Magnetic extraction of the samples measured by EPR identified particles containing Al, Si, Fe, O and Ti. However, there was no indication for biomineralized material in any of the body parts analysed. The only possible way to find out biomineralized material is through identification of such particles within the tissue.

Light microscopy was used to identify Fe³⁺/Fe²⁺ sites in antennae tissue through Prussian/Turnbull's blue staining methods. Further analysis using transmission electron microscopy imaging and diffraction, combined with elemental analysis, revealed the presence of ultra-fine-grained crystals (20–100 nm) of magnetite/maghemite (Fe₃O₄, γ-Fe₂O₃), hematite (α-Fe₂O₃), goethite (α-FeOOH) besides (alumo)silicates and Fe/Ti/O compounds in different parts of the antennae, that is, in the joints between third segment/pedicel, pedicel/scape and scape/head, respectively. The presence of (alumo)silicates and Fe/Ti/O compounds suggests that most, if not all, of the minerals in the tissue are incorporated soil particles rather than biomineralized by the ants. However, as the particles were observed within the tissue, they do

not represent contamination. The amount of magnetic material associated with the Johnston's organ and other joints appears to be sufficient to produce a magnetic-field-modulated mechanosensory output, which may therefore underlie the magnetic sense of the migratory ant.

Lista de figuras:

Capítulo I

Figura I.1: (a) Micrografia obtida de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de uma cabeça com uma antena da formiga *P. Marginata*. S é escapo e p o pedicelo. (b) diagrama da antena de uma himenóptera (abelha *Apis mellifera*) mostrando os graus de liberdade de rotação das junções entre cabeça e escapo (HS) e escapo e pedicelo (SP). A junção entre cabeça e escapo possui três graus de liberdade de rotação (Staudacher *et al.* 2005).

Figura I.2: tipos de antenas encontradas em insetos. Exemplos: filiforme (gafanhotos), moniliforme (cupins e alguns besouros), claviforme (alguns besouros), serreada (alguns machos de louva-a-deus), pectinada (vaga-lumes), capitada (borboletas), geniculada (formigas), plumosa (machos de mosquitos), lamelada (*Drosophila*).

Figura I.3: órgão de Johnston em *Formica rufa*. A parede dorsal do pedicelo é removida para mostrar o arranjo dos escolopídeos dentro do pedicelo (Vowles 1954).

Figura I.4: diagrama, representando a maior parte do segmento antennal de uma abelha operária (*Apis mellifera*) em uma seção longitudinal e em perspectiva e uma pequena seção do terceiro segmento (longitudinal, transversal e em perspectiva) mostrando o órgão de Johnston que consiste de dois grandes grupos de células sensoriais (SC) cujas fibras nervosas (NP) correm para dois nervos antenais (N) e cujas fibras sensoras (SF) estão ligadas a botões (K) na membrana articular. Dois botões são cortados no sentido de seus comprimentos, mostrando a cavidade em forma de cone que se abre para o exterior, enquanto os outros estão inseridos na membrana articular. Tr, traqueia, Hyp, hipoderme, Ch, quitina dura, Ch1, faixas de quitina macias e flexíveis que mantêm o segundo e terceiro segmentos firmemente ligados (McIndoo 1922).

Figura I.5: diagrama de uma sensila mecanoreceptora (Chapman 1998).

Figura I.6: Pelos de Boehm no bulbo articular da formiga *Odontomachus bauri*. Barra de escala: 10 μm . (Ehmer & Gronenberg 1997).

Figura I.7: (a) Vista da parte distal do escapo e início do pedicelo obtido por MEV. Setas mostram *sensilla chaetica*. (b) diagrama da sensila gustativa (Chapman 1998).

Figura I.8: (a) Vista de cima de *sensilla campaniforme* no bulbo articular da antena de formiga *Odontomachus bauri* (Ehmer & Gronenberg 1997). Barra de escala: 10 μm . (b) Diagrama de um *sensillum campaniforme*.

Figura I.9: (a) Micrografia obtida de um MEV mostrando uma *sensila basiconica* (seta vermelha) circundado por várias *sensilas trichodea* em um segmento da antena de formiga *Pachycondyla marginata*. (b) diagrama da sensila olfativa (Chapman 1998).

Figura I.10: *sensilla trichodea* distribuídas ao longo do 3^o segmento da antena de formiga *Pachycondyla marginata*. Na parte mais distal deste segmento algumas *sensilla chaetica* podem ser observadas.

Figura I.11: MEV do flagelômero antennal 11 de um macho africanizado (*Apis mellifera*) mostrando detalhes das *sensilla campaniforme* (seta pequena), *sensilla ampulacea* (seta média), *sensilla coeloconica* (seta longa). SP é um *sensillum placodea*. (Stort & Moraes-Alves 1999).

Figura I.12: Representação esquemática de uma sensila sem poro com encaixe não-flexível capaz de perceber variação térmica e de umidade (Altner & Loftus 1985).

Capítulo II

Figura II.2.1: (a) Diagrama ternário $\text{TiO}_2 - \text{FeO} - \text{Fe}_2\text{O}_3$ mostrando as linhas de soluções sólidas das titanomagnetitas e titanohematitas e o campo das titanomaghemitas. Durante a oxidação de alta e baixa temperatura das titanomagnetitas, a composição volumétrica segue as linhas tracejadas horizontais. (b) Linhas de mesma temperatura de Curie para titanomagnetitas sintéticas (Dunlop & Özdemir 1997).

Figura II.2.2: Célula unitária do espinélio mostrando a localização dos íons em dois dos oito octantes. Os íons de ferro dos sítios A e B da magnetita dão origem a uma subestrutura

magnética na qual o momento magnético de rede da subrede A é antiparalelo ao momento magnético de rede da subrede B.

Figura II.2.3: estrutura cristalina da hematita (Moskowitz 1991). As setas indicam a direção do momento magnético dos íons Fe^{3+} . Acima de -10°C , os momentos magnéticos são paralelos ao plano-c embora não estejam completamente alinhados, mas ligeiramente oblíquos, o que produz uma magnetização espontânea fraca de $\sigma_s=0,4 \text{ emu/g}$. Abaixo de -10°C a direção do antiferromagnetismo muda e se torna paralela ao eixo c e a hematita torna-se um antiferromagneto perfeito.

Figura II.3.1: Espectro de RFM derivada (a) e absorção (b) mostrando alguns parâmetros relevantes que podem ser obtidos.

Figura II.4.1: Partícula encontrada na camada dorsal, ventral ou frontal da abelha *Apis mellifera*. A autora menciona a visualização da membrana já na figura (a). A mesma figura, com outra magnificação, está mostrada em (b) e a seta indica a região onde a possível membrana é visualizada. Barra de escala: $0,1 \mu\text{m}$.

Capítulo III

Figura III.1.1: Orientação do inseto com o eixo longo do corpo (y) perpendicular ao campo magnético (H, paralelo ao eixo z).

Figura III.5.1: comparação entre amostras preparadas por distintos métodos observadas no microscópio óptico. (a) e (b) correspondem a cortes transversais do 3^o segmento enquanto (c) e (d) do escapo. (a) desidratado em acetona e incluído em EPON. (b) e (c) desidratados em etanol, seguido de acetona e incluídos em kit Agar de baixa viscosidade (d) desidratados em etanol, seguido de acetonitril e incluídos em kit Agar de baixa viscosidade. Em (b) setas pretas apontam para nervos antenais, enquanto em (c) e (d) setas brancas apontam para região de músculos. Barra de escala = $20 \mu\text{m}$.

Fig. III.6.1: MEV de uma cabeça com antena de formiga *Pachycondyla marginata* mostrando as direções de corte. Setas brancas indicam o sentido dos cortes transversais para escapo e

flagelo e as setas vermelhas dos longitudinais. Cortes oblíquos também são obtidos dependendo do alinhamento do flagelo em relação ao escapo.

Figura III.8.1: O microscópio eletrônico como uma simples câmera de difração de elétrons.

Capítulo IV

Figura IV.1.1: Espectros de RFM (a) de solo: comparação de diferentes amostras de 1g posteriormente dividida em amostras de 0,500g, 0,250g, 0,125g e 0,100g e extrato magnético 0,01 g (linha tracejada) (pmw 2mW). (b) 5 amostras de solo, $m = 0,0016g$ (pmw 4mW). Intensidade em (b) dividida por 14,1.

Figura IV.1.2: Diagrama dos parâmetros obtidos dos espectros de RFM, segundo Weiss *et al.* 2004 das amostras de terra medidas a temperatura ambiente.

Figura IV.1.3: variação térmica dos espectros (a) T3 e (b) T4.

Figura IV.1.4: Variação térmica dos parâmetros dos espectros de RFM. (a) campo de ressonância, Hr (b) largura de linha, ΔH_{pp} (c) fator de assimetria, Aw, seta aponta para temperatura de transição ($T = 210 K$) (d) 2ª integral ou área do espectro de absorção, S.

Figura IV.1.5: Variação da largura de linha com o inverso da temperatura para a componente CA1 da amostra T3 e da amostra T4. Linha cheia ajuste da eq. I.3.9, com $KV = (2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}$ erg e pré-fator = 725 ± 33 Oe e $KV = (7,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}$ erg e pré-fator = 1370 ± 7 Oe, para CA1 de T3 e T4 respectivamente.

Figura IV.1.6: Espectros a temperatura ambiente de 3 formigas *P. marginata* “mortas”.

Figura IV.1.7: Distribuição dos parâmetros de RFM: (a) Hr, (b) ΔH_{pp} , (c) S para 4 mW e (d) 10 mW.

Figura IV.1.8: Espectros a temperatura ambiente de formigas *P. marginata* “mortas” (a) e “vivas” (b).

Figura IV.1.9: variação térmica dos espectros de (a) 88 escapos, (b) 92 flagelos. pmw: 20mW, ganho: $1 \cdot 10^5$ e 4 varreduras. (c) extratos magnéticos de antena. pmw: 20mW, ganho: $6,3 \cdot 10^4$ e 1 varredura.

Figura IV.1.10: Variações térmicas dos parâmetros dos espectros de RFM de escapos, flagelos e extratos de antena. (a) campo de ressonância – Hr, (b) largura de linha – ΔH_{pp} (c) fator de assimetria – Aw (d) 2ª integral ou área do espectro de absorção.

Figura IV.1.11: Variação da largura de linha com o inverso da temperatura para (a) escapos, (b) flagelos e (c) extratos de antenas. Linha cheia é o ajuste com a eq. I.3.9, $\Delta H_0 = 1313 \pm 28$ Oe, 1238 ± 18 Oe e 1519 ± 25 Oe e $KV = (6,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-14}$ erg, $(7,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-14}$ erg, e $(6,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-14}$ para escapos, flagelos, e extratos de antenas, respectivamente.

Figura IV.1.12: variação térmica dos espectros de (a) cabeças, (b) abdomens e (c) tórax. Pmw: 20mW, ganho: $6,3 \cdot 10^4$ e 1 varredura.

Figura IV.1.13: Variações térmicas dos parâmetros de RFM de extratos de cabeça, abdômen, tórax e antena de formiga. (a) campo de ressonância, (b) largura de linha ΔH_{pp} Hr, (c) fator de assimetria Aw e (d) 2ª integral da derivada da absorção S obtida pelo winepr.

Figura IV.2.1: (a) Solução de solo e seu respectivo padrão de difração (b). Micrografias de partículas de tórax obtidas pelo método de extração magnética (Set/06) (c) e seu padrão de difração (d).

Figura IV.2.2: (a) imagem de campo claro obtida por MET de partículas Fe/O de 50 nm encontradas nos extratos magnéticos de antena da amostra de maio/07 identificada como hematita a partir de seus padrões de difração. (b) padrão de difração de um único cristal de óxido de ferro.

Figura IV.2.3: (a) Dados de EDS obtidos a partir de um único cristal contendo Fe e O. (b) padrão de difração de um destes cristais.

Figura IV.3.1: corte longitudinal ao escapo de uma amostra emblocada em SPURR mostrando a presença de Fe^{3+} na conexão entre a cabeça e o escapo. Seta aponta para uma das regiões azuis encontradas.

Figura IV.3.2: conexão entre escapo e pedicelo. (a) corte oblíquo para microscopia ótica, barra de escala: 200 μm e (b) para MET. Escapo (E) e pedicelo (P), barra de escala: 60 μm .

Figura IV.3.3: semi-seções transversais de segmentos (10 μm) do flagelo de formiga *P. marginata*. (a) amostra emblocada em EPON. (b) amostra desidratada em álcool e acetona emblocada em kit de baixa viscosidade da agar. Setas apontam para nervos antenais. Barra de escala: 20 μm .

Figura IV.4.1: (a) um diagrama de parte da antena. seta aponta para o bulbo, S é o escapo. (b) MEV de parte do bulbo articular, ou junção bola, de uma operária de formiga *Pachycondyla marginata*. Observe parte da distribuição dos pelos de Boehm (setas brancas).

Figura IV.4.2: (a) Diagrama da conexão entre cabeça e escapo (S). Seta indica região observada em (b) MEV dos pelos de Boehm (seta) e sensilas campaniforme (seta pontilhada) podem ser observadas.

Figura IV.4.3: (a) Micrografia obtida por MEV do pedicelo (centro), parte do terceiro segmento (à esquerda) e parte final do escapo (à direita). Setas apontam para sensilas chaetica. O outro tipo de sensila, largamente distribuída sobre a superfície dos dois segmentos vistos na micrografia são as sensila trichodea (b) Micrografia obtida por MEV de um segmento antenal mostrando o socket de uma sensila chaetica (circulo em volta da estrutura). Compare com a sensila trichodea (seta branca aponta para um destas sensilas) onde nenhum socket é observado.

Figura IV.4.4: (a) Diagrama de antena de formiga mostrando escapo, pedicelo e flagelo. A seta aponta para o segmento pedicelo. (b) MEV da região de conexão entre escapo e pedicelo e pedicelo e 3^o segmento. Na parte mais distal do pedicelo, a seta aponta para uma sensila chaetica. Observe que várias sensila chaetica estão presentes nesta linha formando uma espécie de anel nesta região.

Figura IV.4.5: (a) diagrama mostrando flagelo antenal. Seta aponta para o último segmento. (b) MEV de parte deste segmento. Seta aponta para sensila basicônica.

Figura IV.4.6: Micrografias obtida por MET de cortes longitudinais de sensilas do escapo contendo partículas de solo (setas). Através da análise qualitativa por EDS foi possível detectar a presença de Al, Si, Fe, O e Ti.

Figura IV.4.7: MET de sensila mecanoreceptora do escapo. Seta preta: material eletrondenso. Seta branca dendrito sob a forma de um cílio.

Figura IV.5.1: Imagens obtidas por MET de cortes transversais ultrafinos da junção entre o terceiro segmento e o pedicelo. (a) botão quitinoso (diâmetro, 4-5 μm). A seta branca aponta para um longo processo sensorial (diâmetro, 1 μm). Inserção: MEV da antena de *P. marginata*, mostrando o terceiro segmento (3° e o pedicelo (P)). (b) Outro botão quitinoso contendo partículas. (c) Região aumentada do botão quitinoso na qual cristais de hematita e goetita (seta) além de silicatos / aluminosilicatos foram identificados. (d) Padrão de difração do cristal de goetita (seta em c). $d = 0,338; 0,256$ e $0,257$ nm. (e) EDS da região da figura (b)

Figura IV.5.2: (a) Imagens obtidas por MET de cortes transversais ultrafinos da junção entre o pedicelo e o escapo mostrando parte de uma estrutura com partículas circundando-a. Os eixos do elipsóide são mostrados. Inserção: imagem de MEV mostrando a região da junção onde as partículas foram encontradas, parte do escapo (S) e pedicelo (P). (b) EDS das partículas da inserção (região similar de outra grade) mostrando uma grande quantidade de ferro. Inserção: seta aponta para uma partícula identificada como magnetita/maghemita pelo seu padrão de difração de elétrons. $d = 0,37, 0,264$ nm.

Figura IV.5.3: Torque magnético atuando na estrutura proprioceptora encontrada na junção entre escapo e pedicelo, em unidades de energia térmica, como função da susceptibilidade magnética, k , e da espessura da camada de partículas, t , para campo magnético local de 0,3 Oe. A estrutura do tipo célula é considerada como um elipsóide com eixos ($2c = 35 \mu\text{m}$, $2a = 2b = 7 \mu\text{m}$).

Figura IV.5.4: Imagens obtidas por MET de partículas na junção entre escapo e cabeça. (a) dois cristais grandes formados por Fe, Ti e O e o padrão de difração da partícula (seta branca) (b). (c) cristal grande de Fe e O. (d) EDS da partícula apontada em (c).

Lista de tabelas:

Capítulo II

Tabela II.2.1: propriedades gerais de alguns minerais magnéticos. M_s é a magnetização de saturação a temperatura ambiente, T_C é a temperatura de Curie e T_N a temperatura de Néel, acima das quais os materiais tornam-se paramagnéticos, T_M a temperatura de Morin na qual há uma transição do alinhamento antiferromagnético da hematita de perpendicular para paralelo ao eixo-c, $K_{1,2}$ são as constantes de anisotropia magnetocristalina de 1ª e 2ª ordem a temperatura ambiente e “a” a dimensão da célula unitária.

Capítulo III

Tabela III.1: todos os tipos de medidas realizadas em amostras de coletas distintas. RFM – ressonância ferromagnética, MEV – microscopia eletrônica de varredura, MET – microscopia eletrônica de transmissão.

Capítulo IV

Tabela IV.1.1: valores e média dos parâmetros H_r , ΔH_{pp} e S para 4 e 10 mW de formigas vivas e mortas, respectivamente, imersas em quatro substâncias distintas.

Tabela IV.1.2: (a) área S obtida pelo programa winepr e, (b) frações de material magnético (M) corresponde ao grupo de amostras mortas, enquanto (V) ao grupo de amostras vivas. [max] refere-se ao número máximo de partes medidas de uma só vez. (*) amostras para quais somente um valor pode ser obtido, portanto não há desvio padrão calculado.

Tabela IV.1.3: valores médios de H_r , g e ΔH_{pp} para as partes do corpo de formiga *P. marginata* e amostras de solo. (*) valores individuais (**) somente uma amostra contendo 88 escapos e 92 flagelos de mistura de formigas “mortas” e “vivas”.

Tabela IV.1.4: estimativas de diâmetros e as constantes de anisotropia das partes de formigas obtidas a partir dos modelos de (Morais *et al.* 2005, Morais *et al.* 1987) para H_r e ΔH_{pp} .

Tabela IV.2.1: Comparação das distâncias interplanares experimentais (d), em nanômetros (nm), dos extratos do corpo da formiga e soluções do solo e três óxidos de ferro. As porcentagens entre parênteses são as intensidades relativas medidas a partir de difração de raios-X de amostras policristalinas e estão diretamente relacionadas a probabilidade na qual cada ponto de difração apareça em qualquer padrão de difração. Estes dados foram obtidos do Joint Committee for Powder Diffraction Standards (JCPDS). Os números correspondentes aos óxidos de ferro são 19-629 para magnetita, 13-534 para hematita e 29-713 para goetita.

Tabela IV.5.1: Comparação de porcentagens atômicas obtidas por EDS em partículas do solo e das junções: entre o escapo e pedicelo (J E/P), cabeça e escapo (J C/E) e num botão quitinoso entre o pedicelo e 3^o segmento. Entre parênteses estão os aumentos utilizados para cada medida. Na coluna outros elementos incluem-se C, Cu, Na, K e Os.

Introdução

A influência do campo geomagnético em seres vivos vem sendo estudada através de fenômenos naturais, como migração, volta ao lar, etc. Há cerca de três décadas cristais magnéticos foram observados em bactérias magnetotáticas, com a evidência física do fenômeno de magnetotaxia através do alinhamento passivo destas bactérias por um campo magnético (Blakemore 1975). Estudos comportamentais posteriores têm mostrado que o campo magnético terrestre é mais uma fonte de informação do meio ambiente para orientação e navegação de um grande número de animais.

Magnetorecepção em animais é um mecanismo complexo, ainda pouco compreendido, que consiste em detectar o campo geomagnético, transferir a informação recebida para o sistema nervoso, onde é processada e utilizada para distintos propósitos. Entre as hipóteses e modelos que discutem a natureza dos receptores magnéticos, atualmente, a ferromagnética, que sugere nanopartículas magnéticas biomineralizadas como transdutores da informação, e um compasso químico baseado num par de radicais são as mais discutidas.

Partículas magnéticas foram encontradas em tecidos específicos ou em extratos de partes do corpo de animais (O'Leary *et al.* 1981, Vilches-Troya *et al.* 1984, Mann *et al.* 1988, Walker *et al.* 1997, Diebel *et al.* 2000, Hanzlik *et al.* 2000), mas somente na truta rainbow *Oncorhynchus mykiss* (Walker *et al.* 1997) e nos pombos correio (Hanzlik *et al.* 2000, Fleissner *et al.* 2003) a magnetita encontrada parece ter uma conexão neural direta. Estudos comportamentais com insetos sociais tais como cupins, abelhas e formigas mostraram respostas orientacionais e navegacionais ao campo geomagnético (Wiltschko & Wiltschko 1995, Vácha 1997, Walker *et al.* 1997). A observação de partículas de magnetita superparamagnéticas (SPM) no abdômen de abelhas *Apis mellifera* levou à proposta de um sistema magnetoreceptor baseado nestas partículas (Gould *et al.* 1978), que supostamente também foram observadas como grânulos nos trofócitos destas abelhas (Hsu *et al.* 2007).

As formigas, ou pelo menos a maior parte das espécies, são reconhecidas como animais “químicos”. Os feromônios, principais mediadores da comunicação destes animais, são usados por forrageadoras para transferir informações a outras operárias sobre fontes de alimentos ou para alertar outras formigas em relação a um ataque iminente. Marcas do meio

ambiente e luz polarizada são também importantes fontes de informação utilizadas para o processo de retorno ao ninho. A influência do campo geomagnético em diferentes espécies de formigas foi demonstrada para *Formica pratensis* (Camlitepe *et al.* 2005), *Solenopsis invicta* (Anderson & Vander Meer 1993), *Formica rufa* (Camlitepe & Stradling 1995) e *Atta colombica* (Riveros & Srygley 2008), sendo pioneiro o trabalho feito com a formiga *Myrmica ruginodis* mostrando que a antena responde a campos magnéticos, com o pedicelo sendo a parte mais influenciada (Vowles 1954).

A migração da formiga *Pachycondyla marginata* é significativamente orientada em um ângulo médio de 13°, em relação ao eixo norte-sul magnético (Acosta-Avalos *et al.* 2001). Medidas magnéticas de partes do corpo (cabeça, antena, tórax e abdômen) mostraram que a antena apresenta o sinal magnético mais intenso (Wajnberg *et al.* 2004). Baseando-se nestes resultados e nas medidas anteriores em formigas *Pachycondyla marginata* (Acosta-Avalos *et al.* 1999, Wajnberg *et al.* 2000, Wajnberg *et al.* 2004), utilizou-se ressonância ferromagnética (RFM), microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) para caracterizar o material magnético destas formigas e identificar um possível sensor magnético na antena, um órgão sensorial promissor para magnetorecepção.

Capítulo I

Órgãos sensoriais na antena dos insetos e seu possível uso como magnetoreceptores

As antenas nos insetos funcionam como sensores multimodais para o monitoramento do ambiente físico e químico e, portanto, possuem mecanosensores e uma variedade de receptores capazes de perceber estímulos olfativos, de contato químico, de umidade, de temperatura. Quimiorreceptores na antena são importantes para busca, reconhecimento e discriminação de alimentos apropriados, acasalamento e habitats, enquanto os mecanoreceptores na antena desempenham papéis críticos ao evitar súbitos ataques de predadores e são também importantes na percepção de objetos físicos que estão em torno de um animal. O sensor tátil da antena pode ser especialmente importante em insetos noturnos, que frequentemente tem que reconhecer o ambiente físico em condições de completa escuridão. Um comportamento particularmente interessante é o movimento antenal exploratório durante uma busca em um ambiente (Bell 1991). Este movimento ativo pode fornecer informação tátil sobre o ambiente físico mais efetivamente do que aquela obtida com antenas imóveis.

Existem dois tipos principais de antenas: as segmentadas e as flageladas (Schneider 1964). A primeira possui segmentos com aproximadamente a mesma forma e músculos em todos os segmentos, exceto o mais distal, enquanto a segunda possui dois segmentos basais, o escapo e o pedicelo, e um flagelo geralmente composto de muitos segmentos de formas similares. As junções, que conectam os segmentos flagelares, são flexíveis, mas podem mover-se somente passivamente, enquanto que as junções entre o escapo e o pedicelo e entre a cabeça e o escapo possuem músculos que permitem que eles se movam ativamente. Deste modo, mecanoreceptores no flagelo fazem contato com objetos, enquanto aqueles presentes nos dois segmentos basais (escapo e pedicelo) podem desempenhar uma função proprioceptiva para monitorar a orientação antenal. A detecção da posição de um objeto pode ser calculada quando os sinais de saída táteis do flagelo e dos mecanoreceptores no escapo e pedicelo são combinados no sistema nervoso central (Okada & Toh 2001). Veja na Figura I.1a uma micrografia obtida por microscopia eletrônica de

varredura (MEV) da formiga *Pachycondyla marginata* mostrando sua antena flagelada. Na **Figura I.1b** temos o diagrama de uma antena de Himenóptera mostrando os graus de liberdade de movimento deste órgão. O escapo está conectado à cabeça por uma junção monocondílica e, este segmento basal pode ser movido por quatro músculos extrínsecos que estão localizados dentro da cabeça, que dão a este, e, portanto, a toda antena uma grande liberdade de movimentos. Já o pedicelo está conectado ao escapo através de uma junção articulada. Ele pode mover-se em um único plano por um par de músculos confinados dentro do escapo, conhecidos como músculos antenais intrínsecos (**Figura I.1b**). Todos estes músculos juntos controlam os movimentos antenais (**Ehmer & Gronenberg 1997b**).

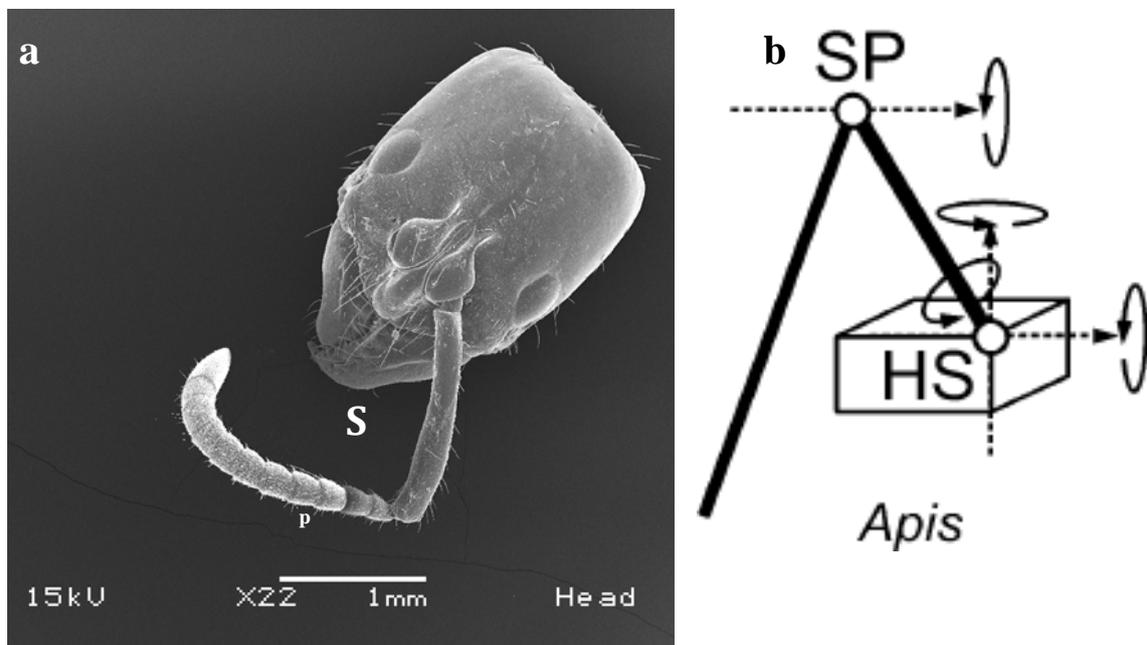


Figura I.1: (a) Micrografia obtida de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de uma cabeça com uma antena da formiga *P. Marginata*. S é escapo e p o pedicelo. (b) diagrama da antena de uma himenóptera (abelha *Apis mellifera*) mostrando os graus de liberdade de rotação das junções entre cabeça e escapo (HS) e escapo e pedicelo (SP). A junção entre cabeça e escapo possui três graus de liberdade de rotação (**Staudacher et al. 2005**).

Os segmentos que compõem o flagelo são os flagelômeros e, o número destes, e a distribuição de sensilas, variam sendo ambos os fatores freqüentemente utilizados para identificação de gênero. Em antenas mais uniformes, como os da classe Diplopoda, todos os segmentos são chamados antenômeros. Algumas antenas, por exemplo, possuem pelos subapicais ou modificações apicais chamadas arista, que é bem desenvolvida em vários Dípteros. Veja na **Figura I.2** um diagrama mostrando estas subdivisões :

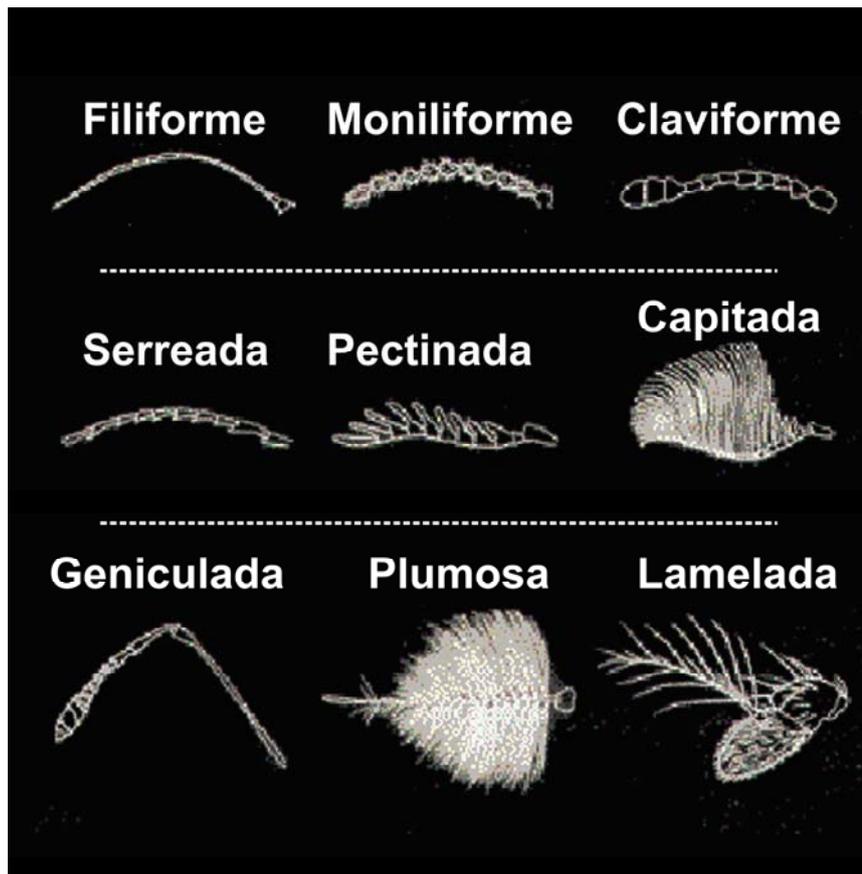


Figura I.2: tipos de antenas encontradas em insetos. Exemplos: filiforme (gafanhotos), moniliforme (cupins e alguns besouros), claviforme (alguns besouros), serreada (alguns machos de louva-a-deus), pectinada (vaga-lumes), capitada (borboletas), genuculada (formigas), plumosa (machos de mosquitos), lamelada (*Drosophila*).

São quatro os tipos básicos de estruturas mecanosensoras existentes: os pelos, sensilas campaniformes, órgãos cordotonais e os receptores de tensão. Estas são encontradas em vários segmentos das antenas de insetos, e podem, em princípio, funcionar

como próprio- e exteroceptores. Podem ser encontrados sozinhos ou em grupos, para formar, por exemplo, placas ou lâminas de pelos (pelos de Böhm) e o órgão de Johnston, um dos mecanosensores mais estudados devido à crescente constatação de sua importância funcional. O órgão de Johnston está localizado no segundo segmento antenal (pedicelo) de insetos de diferentes ordens, como, Orthoptera, Coleoptera, Himenóptera, Díptera, Lepidóptera e Ephemeroptera (Field & Matheson 1998).

Morfologicamente o órgão de Johnston é caracterizado pela presença de conjuntos de unidades sensoriais que consistem de neurônios sensoriais e células de suporte chamadas escolopídeos, simetricamente distribuídos dentro do pedicelo. A principal característica dos escolopídeos é o espaço escolopóforo, uma cavidade em forma de fuso, que envolve os dendritos ciliados dos neurônios. Veja na [Figura I.3](#) o diagrama do órgão de Johnston (Vowles 1954) obtido a partir de observações da formiga *Formica rufa*.

Nos himenópteras, as partes distais dos escolopídeos se ligam a uma série de botões quitinosos, que são cavidades cônicas, presentes na membrana articular entre o pedicelo e o 3º segmento, distribuídos em forma de anel. A membrana articular intersegmentar (ArtM), que sustenta os botões quitinosos (K), é desprotegida e está totalmente exposta ao ar. A [Figura I.4](#) mostra um diagrama desta região (McIndoo 1922).

A percepção do movimento da antena pelo órgão de Johnston, foi previamente associada à audição, percepção da gravidade e controle de voo (Sandeman 1976). Abelhas *Apis mellifera* forrageadoras, por exemplo, utilizam a “waggle dance”, para comunicar às outras forrageadoras a direção e distância das fontes de alimento (Frisch 1967). O som e os fluxos de ar gerados pela asa e vibrações abdominais da abelha são percebidos pela antena de uma outra abelha e o órgão de Johnston funciona como detector para decodificação das mensagens da dança (Tsujiiuchi et al. 2007). No caso de Diptera, o órgão de Johnston foi associado à detecção de sons de campo próximo, que permite detectar a vibração das asas de um macho de moscas *Drosophila melanogaster* (Eberl et al. 2000, Göpfert & Robert 2002) e de uma fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (Cator et al. 2009). No entanto, trabalho recente (Eatock 2009) sugere que o órgão de Johnston é mais do que um simples detector de sons e gravidade, sendo considerado como um ouvido complexo, com funções compartimentalizadas, nas quais aglomerados de neurônios especializados possuem distintas funções mecanosensoras.

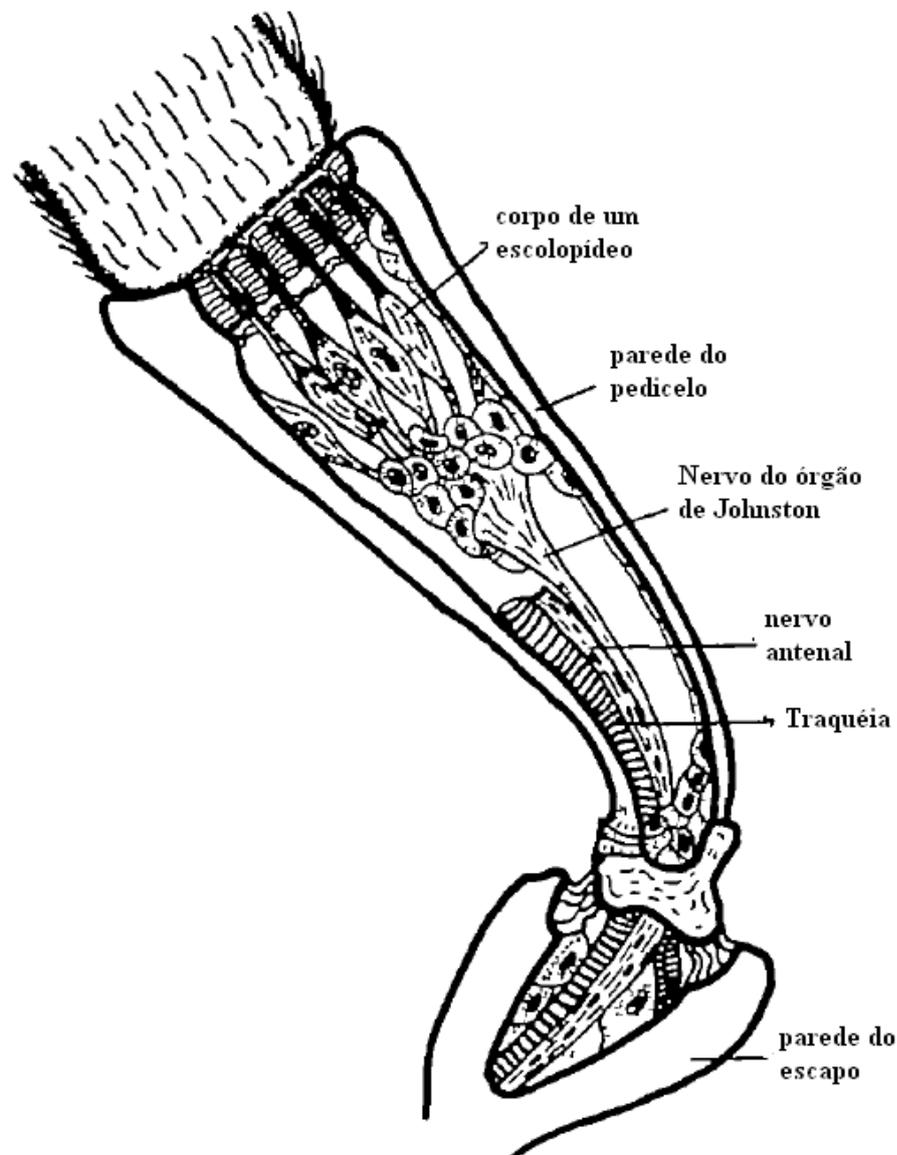


Figura I.3: órgão de Johnston em *Formica rufa*. A parede dorsal do pedicelo é removida para mostrar o arranjo dos escolopídeos dentro do pedicelo (Vowles 1954).

A mosca *Drosophila melanogaster*, por exemplo, pode distinguir estímulos causados por vento, som e gravidade (Yorozu *et al.* 2009; Kamikouchi *et al.* 2009), ativando diferentes conjuntos de neurônios. Assume-se que a percepção de gravidade está associada à presença de agregados cristalinos que se sedimentam sobre receptores, estatólitos, capazes de

perceber a gravidade em plantas, peixes (O'Leary *et al.* 1981), lulas e humanos, que não haviam ainda sido encontrados em insetos.

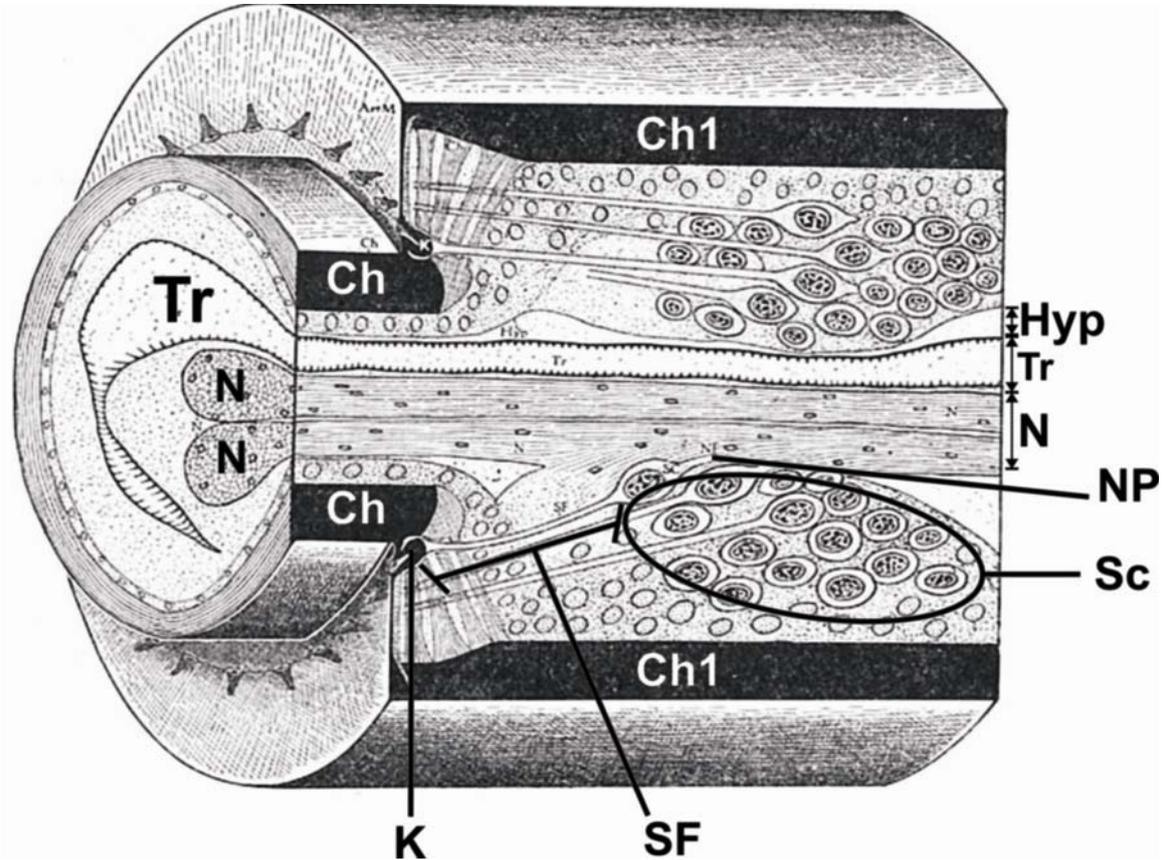


Figura I.4: diagrama, representando a maior parte do segmento antenal de uma abelha operária (*Apis mellifera*) em uma seção longitudinal e em perspectiva e uma pequena seção do terceiro segmento (longitudinal, transversal e em perspectiva) mostrando o órgão de Johnston que consiste de dois grandes grupos de células sensoriais (SC) cujas fibras nervosas (NP) correm para dois nervos antenais (N) e cujas fibras sensoras (SF) estão ligadas a botões (K) na membrana articular. Dois botões são cortados no sentido de seus comprimentos, mostrando a cavidade em forma de cone que se abre para o exterior, enquanto os outros estão inseridos na membrana articular. Tr, traqueia, Hyp, hipoderme, Ch, quitina dura, Ch1, faixas de quitina macias e flexíveis que mantêm o segundo e terceiro segmentos firmemente ligados (McIndoo 1922).

Além do órgão de Johnston, o órgão de Janet, também um órgão cordotonal, está associado aos movimentos da antena. É encontrado na cabeça da abelha *Apis mellifera* e em formigas, conectando o tentório com a membrana da junção cabeça-escapo. Este órgão está ligado à parte dorsal da membrana da junção, sugerindo que o mesmo responde a movimentos ascendentes do escapo. O órgão de Janet foi encontrado somente na ordem himenóptera.

Uma grande variedade de sensilas pode ser encontrada nas antenas de insetos e o estudo adequado de sua morfologia e estrutura permitem que suas funções sejam determinadas. A sensila compreende um conjunto completo de estruturas cuticulares, que podem ou não serem externas, células sensoriais e outras estruturas necessárias à obtenção de uma unidade funcional, que responde a estímulos mecânicos, químicos, de contato, etc. As células sensoriais bipolares apresentam o dendrito com uma região ciliar que se transforma num cílio. O cílio transformado, que está presente na conexão com a estrutura cuticular, pode apresentar especializações dependendo da sua função. Três, ou em alguns casos quatro, células envelopes envolvem as células sensoriais (Keil 1997). A célula envelope externa (tormógena) secreta a cutícula da base do pelo sensorial durante a ontogênese (conjunto de processos que ocorrem durante o desenvolvimento do indivíduo), a célula do meio (tricógena) forma o pelo propriamente dito, enquanto que a mais interna (tecógena) forma a bainha dendrítica.

As sensilas podem, em geral, ser classificadas como multiporosas, uniporosas e aporosas (Zacharuk 1985). Sensilas que possuem poros são associadas à quimiorrecepção (olfato e gustação). Neste caso, os poros podem ser numerosos e distribuídos sobre toda a parede da sensila (sensilas multiporosas) ou restritas à sua ponta (sensila uniporosa) (Zacharuk 1985). Em alguns casos, sensilas aporosas podem ser associadas a glândulas exócrinas, conhecidas como glândulas acessórias (Isidoro *et al.* 1996, Isidoro *et al.* 2001). As sensilas não-porosas estão associadas a mecano- (tato), termo- e higrorrecepção (McIver 1975).

A terminologia usada para as sensilas encontradas na literatura é muitas vezes confusa e inconsistente, e, por esta razão, as sensilas neste texto são classificadas a partir das sugestões de distintos autores, identificados em cada sensila a ser descrita.

Algumas sensilas que possuem uma parte externa na forma de um pelo, escama, cerda ou pino funcionam como mecanoreceptores. As sensilas mecanoreceptoras em forma de pelo são normalmente chamados de pelos de Böhm e *sensilla chaetica*, que podem funcionar somente como mecanoreceptores ou também como quimiorreceptores (Mclver 1975). Em insetos as sensilas mecanoreceptoras não possuem poros ou aberturas na parede do pelo e são inervadas por um neurônio. O pelo está ligado à base do encaixe através de uma membrana articular. Estruturas do encaixe, bem como a altura e diâmetro da base restringem o movimento do pelo. O dendrito está ligado através da capa cuticular ao centro ou a um lado da base do pelo e este último continua para além do final do dendrito e se insere na parede do pelo a diferentes distâncias da base (Figura I.5). Durante a estimulação, a ponta sensível do dendrito se mantém aparentemente firme em sua posição, enquanto alavancas cuticulares auxiliares, que são invaginações do revestimento cuticular, transmitem a força mecânica para a ponta do dendrito, quando o pelo é movido.

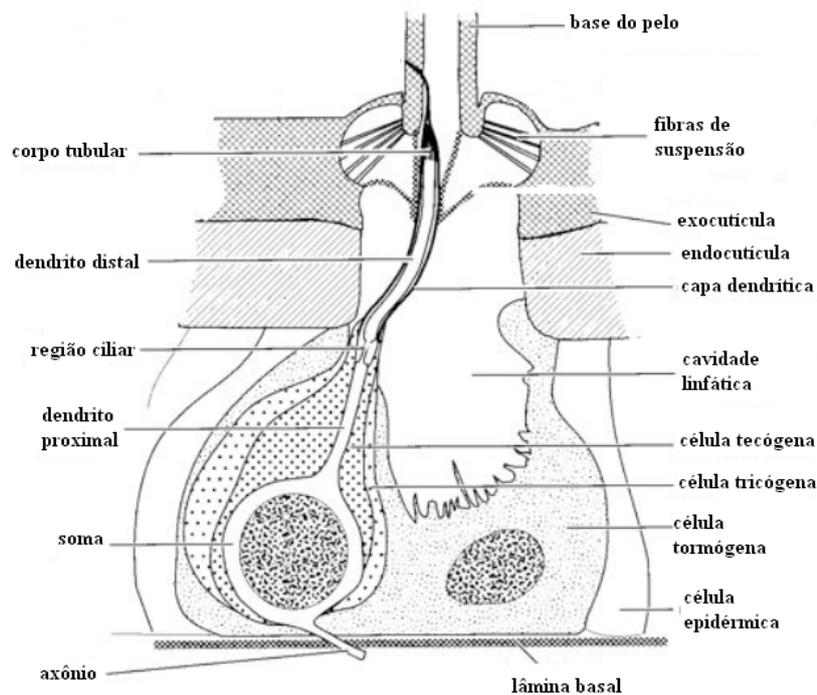


Figura I.5: diagrama de uma sensila mecanoreceptora (Chapman 1998).

As características correspondentes a cada uma destas sensilas mecanoreceptoras são descritas abaixo:

Pelos de Bohm ou lâmina de pelos (Thurm 1963, Thurm 1964): são sempre encontrados em áreas opostas à membrana articular intersegmental entre a cabeça e o escapo, entre o escapo e o pedicelo, no escapo e no pedicelo, organizados em arranjos distintos com pelos similares estando mais próximos entre si. A localização exata do conjunto de pelos reflete o arranjo específico das junções nas diferentes espécies e indicam como o movimento antenal pode ser modulado pela ativação de uma ou mais lâminas de pelos (Okada & Toh 2001). Estudos em formigas e outras himenópteras mostraram que cada conjunto de pelos encontrado nestas áreas são sensíveis à gravidade quando todas as outras junções estão fixadas mecanicamente (Schneider 1964). Também funcionam como proprioceptores percebendo o movimento da antena (Schneider 1964).

O escapo da abelha *Apis mellifera* se insere na cabeça através de uma junção monocondílica, encontrada em outras himenópteras. O estímulo apropriado para estes pelos é o movimento do escapo em sua base, quando as paredes do encaixe ou as membranas intersegmentais desviam os pelos. A deflexão livre deste pelo está restrita a uma direção, já que estes pelos estão posicionados assimetricamente dentro de uma depressão do tipo cálice e próximos à parede deste (Figura I.6) (Ehmer & Gronenberg 1997a).

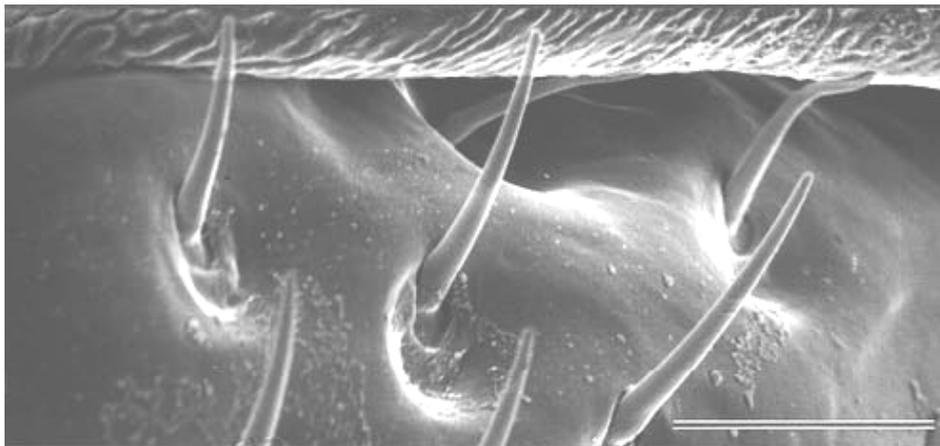


Figura I.6: Pelos de Boehm no bulbo articular da formiga *Odontomachus bauri*. Barra de escala: 10 μm . (Ehmer & Gronenberg 1997a).

A direção na qual a antena aponta deve ser sinalizada proprioceptivamente pela subárea específica onde este conjunto de pelos é defletido. Okada e Toh (2000) mostraram que os pelos de Bohm no escapo da barata *Periplaneta americana* são importantes para a detecção táctil de objetos no plano horizontal.

Sensilla chaetica (cerdas sensoriais) (Dumpert 1972a, Schneider 1964, Altner & Prillinger 1980): são *sensilla trichodea* que se diferenciam desta pela presença de uma membrana circular especializada e flexível na base. Estas cerdas são ligeiramente afiladas, possuem sulcos longitudinais profundos e emergem de um encaixe bem definido que na superfície tem a forma de um anel cuticular (Figura I.7a). Um poro cuticular é algumas vezes encontrado próximo à base. O pelo é reto ou levemente curvado e forma um ângulo de aproximadamente 60° com a superfície antenal. Funcionam como mecanosensores ou quimiosensores de contato (Hashimoto 1990, Isidoro *et al.* 1998).

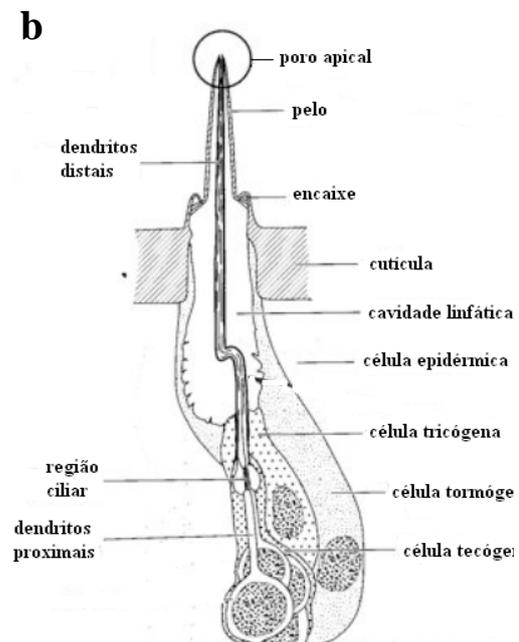
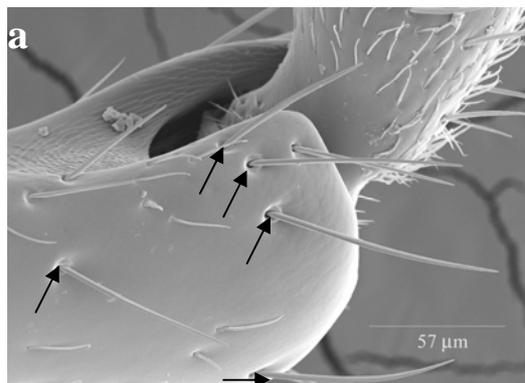


Figura I.7: (a) Vista da parte distal do escapo e início do pedicelo obtido por MEV. Setas mostram *sensilla chaetica*. (b) diagrama da sensilla gustativa (Chapman 1998).

A *sensilla chaetica* do besouro *Psylliodes chrysocephala* L., foi investigada ultraestruturalmente e, descobriu-se, que a mesma é innervada por 5 ou 6 neurônios (Isidoro *et al.* 1998). O dendrito de um destes neurônios termina em um corpo tubular na base do pelo, enquanto que dendritos dos outros neurônios chegam, sem ramificações, à ponta

deste. Tal estrutura é típica de uma sensila com funções gustativas (veja diagrama na [Figura I.7b](#)) e mecanosensoras, resultado confirmado por estudos de eletrofisiologia ([Isidoro et al. 1998](#)). Esta sensila está presente em distintos flagelômeros, distribuídos de maneira irregular. A intensidade da resposta desta sensila a um estímulo mecânico ou químico depende da sua posição na antena do inseto. As *sensilas chaetica* encontradas no escapo e pedicelo de formigas possuem função mecanoreceptora ([Isidoro et al. 1998](#)), enquanto as presentes nos segmentos apicais do besouro *P. chysocephala* respondem a compostos químicos presentes na superfície de folhas ([Isidoro et al. 1998](#)).

Outro tipo de mecanoreceptor encontrado e descrito em várias partes do corpo de muitas espécies de insetos são as *sensilas campaniformes* ([Thurm 1964](#), [Dumpert 1972a](#)). Esta estrutura possui uma forma de cúpula, elíptica ou circular, que algumas vezes possui uma pequena fenda central localizada no meio de uma indentação cuticular suave ([Figura I.8a](#)). A forma elíptica da estrutura cuticular fornece a base para sensibilidade direcional ([Heinzel & Gewecke 1979](#), [Staudacher et al. 2005](#)) estando o eixo de maior sensibilidade alinhado ao longo do eixo menor do elipsóide ([Staudacher et al. 2005](#)). A sensila *campaniforme* contém uma célula receptora do tipo bipolar. O segmento mais externo está localizado dentro de um espaço linfático, e a ponta, que contém o corpo tubular, está fechado por uma capa ([Figura I.8b](#)). Localizam-se próximas às junções presentes nos membros, e são mais numerosas nas bases dos halteres nas Dípteras. Os halteres batem em sincronia com as asas durante o vôo, desenvolvendo um momento angular tal que, uma mudança no vôo, altitude ou direção induz um torque em suas bases que são detetadas por três arranjos de sensilas campaniformes, cada uma orientada de forma a sentir a força resultante da rotação em um plano diferente ([Dickinson 1999](#)). No caso dos himenópteras estas sensilas são encontradas na base do escapo e medem a deformação da cutícula, estimuladas pela indentação desta. Em formigas *Odontomachus* estas sensilas estão presentes no escapo, no pedicelo e, também no bulbo articulatório, que liga o escapo à cabeça e, estão organizadas de modo a sentir o mais alto grau de estresse causado pela retração antenal, o movimento mais rápido das antenas destas formigas ([Ehmer & Gronenberg 1997a](#)). Em besouros *Bembidion properam* as cúpulas destas sensilas são mais circulares, maiores, enquanto que no pedicelo e escapo os segmentos são menores, possuindo freqüentemente forma irregular ([Merivee et al. 2002](#)). A variação de tamanho e

estruturas das porções cuticulares está normalmente relacionada a características específicas do estímulo percebido em uma localização particular da sensila (Melver 1975).

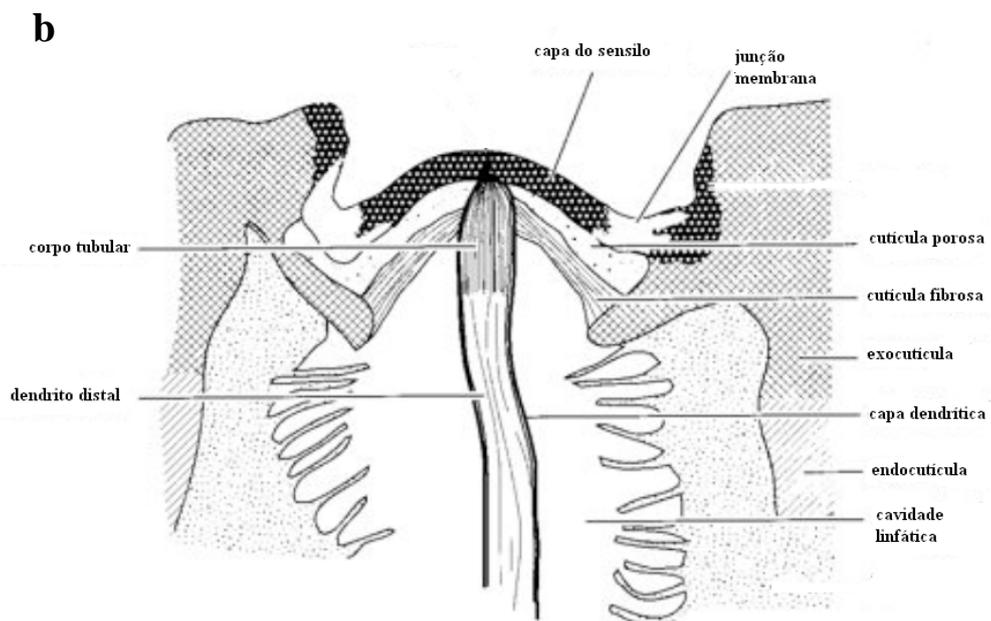


Figura I.8: (a) Vista de cima de *sensilla campaniforme* no bulbo articular da antena de formiga *Odontomachus bauri* (Ehmer & Gronenberg 1997a). Barra de escala: 10 μm . (b) Diagrama de um *sensillum campaniforme*.

Odores são especialmente importantes para insetos, já que muitas espécies usam o olfato como primeira modalidade sensorial. A antena e os palpos são os órgãos envolvidos na detecção destes. Diferentes tipos de sensilas olfativas estão presentes na antena de insetos e algumas delas serão descritas a seguir:

Sensilla basiconica (pinos sensoriais ou cones) (Altner & Prillinger 1980): Este tipo de sensila sempre consiste de duas partes, um pino e um encaixe (Figura I.9 a). Quando está presente junto com a *sensilla trichodea* na antena, elas são relativamente menores e usualmente possuem uma parede mais fina. A cutícula do pino possui muitos poros, inclusive na parte distal, e por este motivo elas são consideradas sensilas olfativas (Masson 1972, Martini 1986). Veja um esquema de uma sensila olfativa na Figura I.9b.

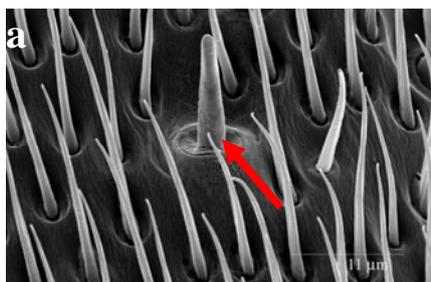
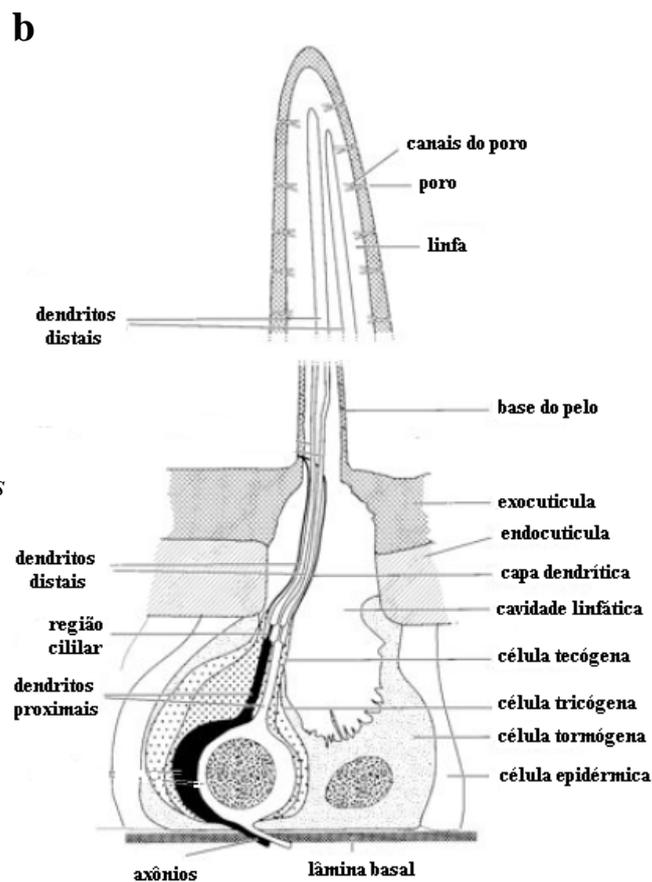


Figura I.9: (a) Micrografia obtida de um MEV mostrando uma *sensila basiconica* (seta vermelha) circundado por várias *sensilas trichodea* em um segmento da antena de formiga *Pachycondyla marginata*. (b) diagrama da sensila olfativa (Chapman 1998).



Sensila trichodea (Dumpert 1972b, Martini & Schmidt 1984): são encontradas na maioria dos insetos e são pelos que não possuem anel cuticular basal que serve como uma

membrana articular (Figura I.10), como no caso das *sensilas chaetica*. As *sensilla trichodea* de mariposas macho respondem a compostos relacionados à feromônios sexuais de fêmeas (Keil & Steinbrecht 1984, Zacharuk 1985, Hansson *et al.* 1986, Hallberg *et al.* 1994). Existem diferenças importantes no número destas sensilas entre machos e fêmeas de várias espécies de besouros, o que sugere esta mesma função (Merivee *et al.* 2002). A Figura I.10 mostra o 3º segmento da antena de formiga *Pachycondyla marginata* com uma grande distribuição deste tipo de sensila.

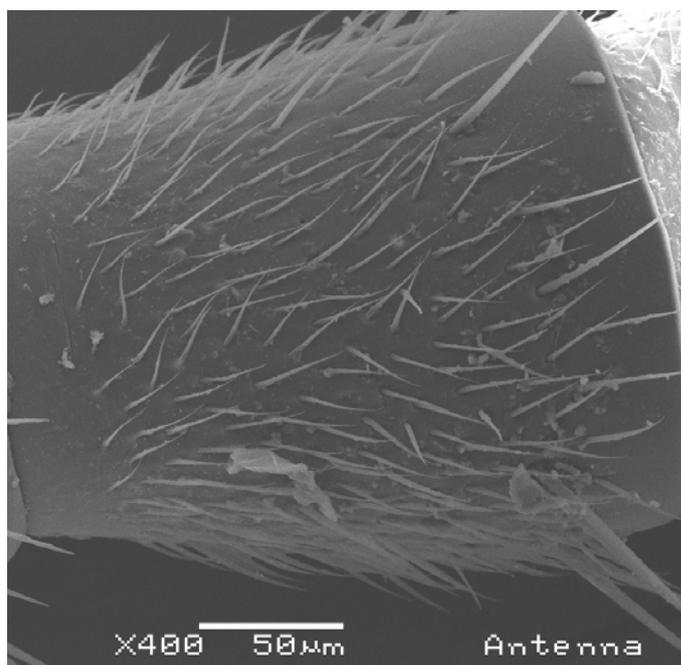


Figura I.10: *sensilla trichodea* distribuídas ao longo do 3º segmento da antena de formiga *Pachycondyla marginata*. Na parte mais distal deste segmento algumas *sensilla chaetica* podem ser observadas.

Sensilla coeloconica (fendas-pinos sensoriais) (Dumpert 1972a, Waldow 1970, Altner & Prillinger 1980): são cones na base de depressões na cutícula antenal (Figura I.11). Nas Lepidóptera, os sulcos relativamente largos são protegidos por microtríquias. Estas sensilas são inervadas por 4 ou 5 fibras nervosas que formam um aglomerado e terminam na ponta do cone. A função desta sensila deve ser olfativa porque os cones possuem poros nas bases dos sulcos (Hashimoto 1990).

Sensilla placodea (discos olfativos): são estruturas ovais transparentes e com a superfície externa lisa ou podendo também ser perfurada (Gonçalves 2007), desenvolvendo-se quase ao nível da superfície da cutícula antenal (Figura I.11). Segundo (Slifer 1970), as *sensilla placodea* podem também se apresentar um pouco elevadas em relação à superfície antenal ou se originar acima dela, formando uma pequena cúpula.

Sensilla ampullacea (Kleineidam & Tautz 1996): Estas sensilas parecem-se com as coeloconica, mas são distintas pelo fato de que o pelo da segunda está mais profundamente situada dentro da câmara e também devido à aparência na superfície do pelo sensor (Figura I.11).

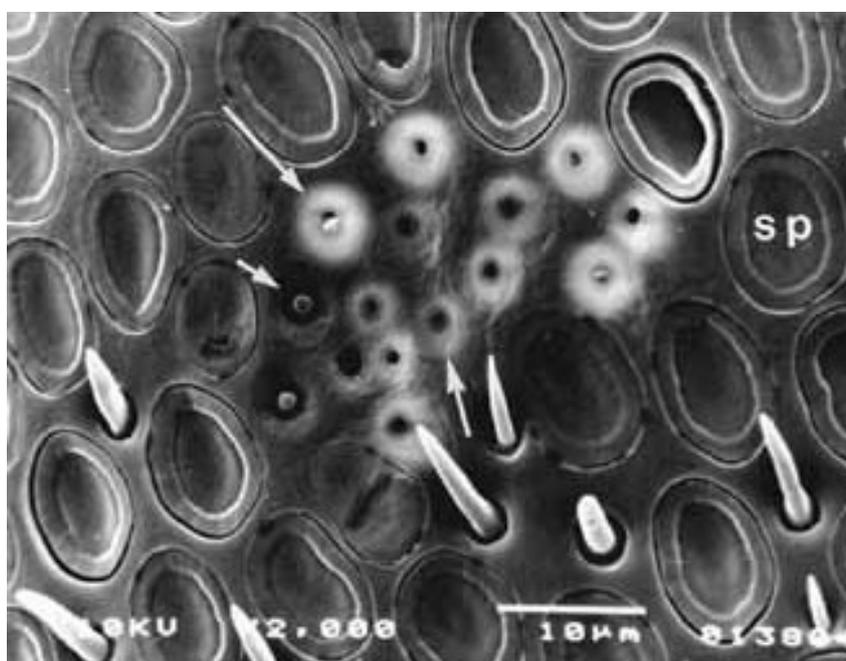


Figura I.11: MEV do flagelômero antenal 11 de um macho africanizado (*Apis mellifera*) mostrando detalhes das *sensilla campaniforme* (seta pequena), *sensilla ampullacea* (seta média), *sensilla coeloconica* (seta longa). SP é um *sensillum placodea*. (Stort & Moraes-Alves 1999).

São provavelmente receptores de temperatura, umidade ou dióxido de carbono (CO₂), já que os pelos sensores não possuem poros (Jaisson 1969, Masson & Friggi 1971). Para insetos sociais o registro e monitoramento dos níveis de CO₂ é de vital importância, já

que esta substância é letal em altas concentrações e, tais concentrações podem ocorrer, por exemplo, em ninhos de formigas. Na **figura I.12** mostra-se um esquema com a estrutura de um higrorreceptor.

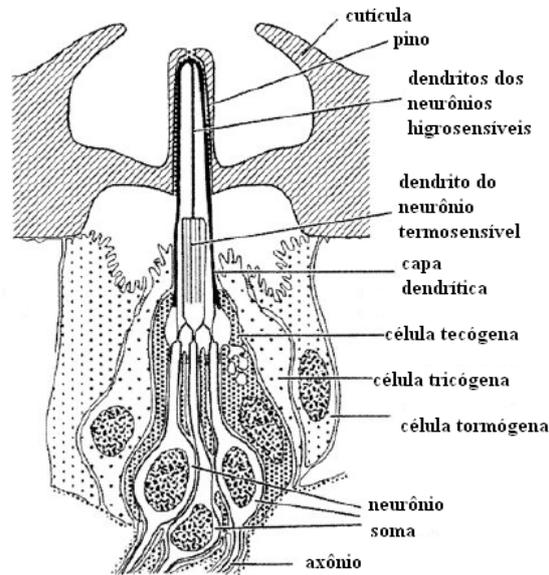


Figura I.12: Representação esquemática de uma sensila sem poro com encaixe não-flexível capaz de perceber variação térmica e de umidade (Altner & Loftus 1985).

Capítulo II

Revisão

1. Orientação e navegação

O deslocamento de grupos de animais em busca de nichos ecológicos que garantam uma nutrição adequada, desenvolvimento e reprodução é uma conduta freqüente no reino animal. Embora a restrição de recursos ecológicos pareça ser o estímulo mais importante na promoção da migração animal, condutas instintivas geradas por fatores genéticos ou adquiridas também influenciam este comportamento (Ridley 2003).

Outro aspecto da conduta migratória está relacionado aos elementos que direcionam o animal durante este processo de busca de uma meta específica. A orientação é entendida como o ato de estabelecer, mediante um processamento de informação ativa funcional, a correlação do movimento com uma direção de referência. Já a navegação pode ser definida como o processo pelo qual um animal primeiro determina sua posição em relação a uma meta e, posteriormente, estabelece um curso para alcançá-la. Estes dois passos são consistentes com o processo de “bússola” e “mapa”, respectivamente propostos por (Kramer 1953). Quando se relaciona a obtenção destas informações ao campo magnético terrestre, o processo tipo “bússola” pode estar baseado na componente horizontal do campo geomagnético, comumente chamado de polaridade e no sentido da componente vertical, chamado de inclinação. Enquanto o primeiro distingue o norte e sul magnético, usando a polaridade do campo magnético, o segundo distingue entre a direção aos pólos quando a componente vertical dirige-se para baixo do plano horizontal (positiva, hemisfério Norte) e a direção ao equador quando estas dirigem-se para cima (negativa, hemisfério Sul) (Wiltschko *et al.* 1993, Wiltschko & Wiltschko 2005).

No grupo de insetos sociais, a casta de forrageadores possui múltiplas ferramentas e estratégias para orientação que podem ser divididas em duas categorias básicas: sugestões egocêntricas que incluem movimento medido pelas células sensoriais proprioceptoras e visão, que o inseto utiliza como referência (Wehner *et al.* 1996, Collet & Collet 2000). Entre as sugestões geocêntricas estão as marcas do meio ambiente e odores que permitem ao inseto determinar sua posição em relação ao ninho ou a outros locais (Wehner *et al.*

1996). As abelhas *Apis mellifera* e as formigas do deserto, *Cataglyphis spp.*, integram a distância e direção na qual elas se movem através do espaço para se orientar na direção do ninho (Wehner 1997). Sugestões celestiais, incluindo o azimute (Santschi 1911) e luz polarizada (Frisch 1967), fornecem a abelhas e formigas referências direcionais (Labhart 1986, Rossel & Wehner 1986, Labhart & Meyer 2002). O horizonte e as copas das árvores também podem fornecer sugestões geocêntricas às formigas (Hölldobler 1980, Fukushi 2001, Fukushi & Wehner 2004, Andel & Wehner 2004).

O campo magnético terrestre tem sido considerado como uma pista importante para orientação de animais, sendo os migratórios os mais estudados. Experimentos comportamentais em distintos grupos de animais (Gould 2008, Lohmann *et al.* 2008, Wiltschko *et al.* 2008), inclusive com insetos (Esquivel *et al.* 2007) suportam esta hipótese. Algumas formigas são capazes de retornar a seus ninhos mesmo quando o céu está nublado indicando que elas não necessitam de informação celestial ou marcas no ambiente para realizar este trajeto (por exemplo, Ronacher *et al.* 2001). A influência do campo magnético em formigas também foi mostrada em *Formica rufa* (Camlitepe & Stradling 1995) e *Oecophylla smaragdina* (Jander & Jander 1998). Banks & Srygley (2003) mostraram que as formigas saúvas, *Atta colombica*, respondem à reversão de polaridade do campo magnético local, com um desvio de 75° da posição prevista em relação às formigas controle, quando o céu está nublado. Sugeriu-se que o campo geomagnético é o responsável pela orientação em um ângulo de 13°, na média, em relação ao eixo norte-sul magnético na migração da formiga *Pachycondyla marginata* (Acosta-Avalos *et al.* 2001).

No entanto, o estudo da magnetorecepção está restrito a estudos comportamentais em uma variedade de grupos de animais, poucos anato-fisiológicos em peixes, pombos e abelhas (Walker *et al.* 1997, Fleissner *et al.* 2003, Hsu & Li 1993, Hsu *et al.* 2007) e modelos teóricos (Wiltschko & Wiltschko 2005). A compreensão do mecanismo depende de uma abordagem multidisciplinar, onde também é importante identificar receptores especializados, associados a estrutura nervosa que transmitam as informações recebidas a centros de processamento no cérebro dos animais. Até o momento, nenhum destes elementos foi identificado ou caracterizado com um alto grau de certeza em grupos de animais pertencentes a distintas espécies. De qualquer forma, existem alguns estudos que estabelecem diretrizes, a serem discutidas posteriormente, que permitem propor a existência

de magnetoreceptores nos olhos (Ritz *et al.* 2000, Ritz *et al.* 2004), na glândula pineal (Semm & Demaine 1986) ou no bico do pombo (Hanzlik *et al.* 2000, Fleissner *et al.* 2003, Davila *et al.* 2003). Medidas magnéticas da antena de formiga *Pachycondyla marginata* (Wajnberg *et al.* 2004), associadas aos experimentos comportamentais nesta (Acosta-Avalos *et al.* 2001) e em outras duas espécies de formiga (Vowles 1954), estimularam a proposição da antena deste inseto como um órgão magnetoreceptor. Tanto as partículas que seriam os possíveis magnetosensores, quanto as estruturas sensoriais presentes neste órgão são discutidas a seguir.

2. Óxidos de ferro e titânio

Óxidos de ferro, hidróxidos e óxidos hidróxidos consistem de arranjos de íons Fe e íons O^{2-} e OH^- , enquanto os minerais magnéticos de titânio são obtidos a partir da substituição de Ti^{4+} nos sítios de ferro, medidas a partir de um parâmetro de composição denominado x. Ambas as composições são convenientemente representadas em um diagrama ternário Ti^{4+} - Fe^{2+} - Fe^{3+} (Figura II.2.1).

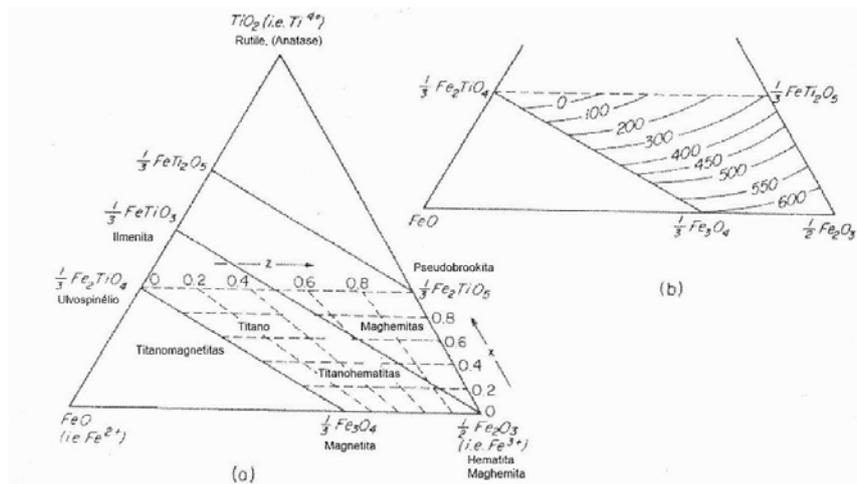


Figura II.2.1: (a) Diagrama ternário TiO_2 – FeO – Fe_2O_3 mostrando as linhas de soluções sólidas das titanomagnetitas e titanohematitas e o campo das titanomaghemitas. Durante a oxidação de alta e baixa temperatura das titanomagnetitas, a composição volumétrica segue as linhas tracejadas horizontais. (b) Linhas de mesma temperatura de Curie para titanomagnetitas sintéticas (Dunlop & Özdemir 1997).

Da esquerda para a direita há um aumento na razão $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, enquanto que da base para o topo do diagrama há um aumento na quantidade de Ti^{4+} .

As propriedades cristalográficas e magnéticas de alguns minerais estão mostradas na **tabela II.2.1**

Mineral (sistema cristal.)	Composição	M_s (emu/cm ³)	T_C (K)	K_1 (erg/cm ³)	a (Å)
Magnetita (cúbica)	Fe_3O_4	480	850 T_C	$-1,35 \cdot 10^5$ $-0,28 \cdot 10^5$ (K ₂)	8,396
Maguemita (cúbica ou tetragonal)	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	380	820-986 T_C	$-4,65 \cdot 10^4$	8,337 (a ₀) 24,99 (c ₀)
Titanomagnetita (cúbica)	$\text{Fe}_{2,4}\text{Ti}_{0,6}\text{O}_4$	125	423 T_C	$2,02 \cdot 10^3$	8,482
Hematita (trigonal)	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	~ 2,5	956 T_C 260 T_M	$1,2 \cdot 10^6$ (eixo c)	5,034 (a ₀) 13,749 (c ₀)
Goetita (ortorrômbica)	$\alpha\text{-FeOOH}$	~ 2	400 T_N		4,596 (a ₀) 9,957 (b ₀) 3,021 (c ₀)

Tabela II.2.1: propriedades gerais de alguns minerais magnéticos. M_s é a magnetização de saturação a temperatura ambiente, T_C é a temperatura de Curie e T_N a temperatura de Néel, acima das quais os materiais tornam-se paramagnéticos, T_M a temperatura de Morin na qual há uma transição do alinhamento antiferromagnético da hematita de perpendicular para paralelo ao eixo-c, $K_{1,2}$ são as constantes de anisotropia magnetocristalina de 1ª e 2ª ordem a temperatura ambiente e “a” a dimensão da célula unitária.

A magnetita é um óxido férrico que apresenta uma forte magnetização e é mais comumente encontrada em rochas. A magnetita tem uma estrutura espinélio inversa e difere da maioria dos óxidos de ferro por conter íons divalentes, Fe^{2+} , e trivalentes, Fe^{3+} , e possui fórmula estrutural $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$. Os íons de ferro octaédricos (sítios B) estão indicados

entre colchetes e o íon de ferro tetraédrico (sítios A)–fora do colchete. A célula unitária é uma rede cúbica de face centrada (Figura II.2.2).

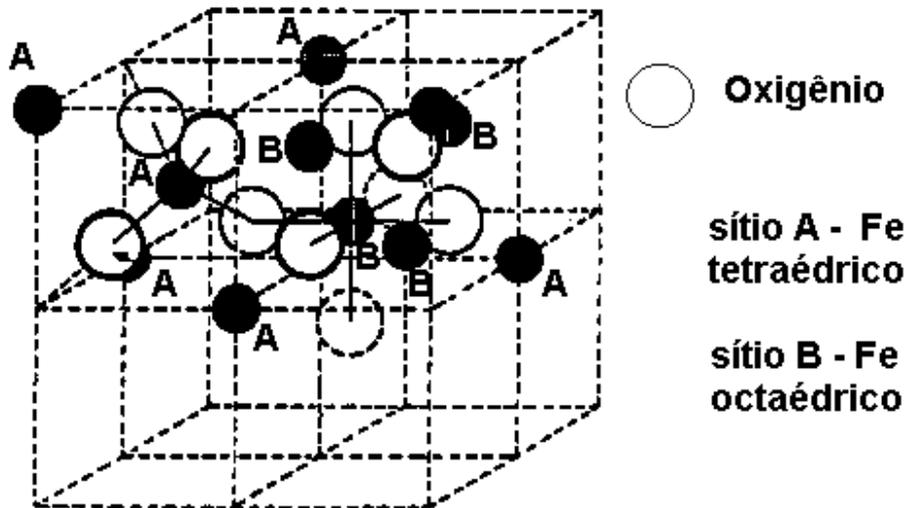


Figura II.2.2: Célula unitária do espinélio mostrando a localização dos íons em dois dos oito octantes. Os íons de ferro dos sítios A e B da magnetita dão origem a uma subestrutura magnética na qual o momento magnético de rede da subrede A é antiparalelo ao momento magnético de rede da subrede B.

A baixas temperaturas ocorre uma transição de fase da magnetita, que foi primeiramente observada através de medidas do calor específico, resistência elétrica e outras propriedades deste mineral. Dependendo da impureza e da estequiometria da amostra, esta transição ocorre entre 100-120K. Belov (1993) sugeriu que existem dois tipos de transição distintas nesta faixa de temperatura, a primeira entre 100 e 120 K, chamada temperatura de transição (T_t), que foi relacionada a uma transição estrutural eletrônica que gera uma anisotropia magnetoelástica espontânea com uma variação brusca no valor de K_1 e, a segunda, entre 130 e 135 K, a temperatura de ordenamento (T_{or}), uma transição associada a magneto-orientação

Em 1941, Verwey supôs que esta transformação era uma transição de fase estrutural-eletrônica. Acima de 100-120K (T_V), os íons Fe^{3+} e Fe^{2+} estão randomicamente distribuídos nos sítios B, tornando o salto de elétrons entre os íons de Fe deste sítio

energeticamente favorável. Na temperatura de transição surge um arranjo ordenado, definido classicamente como o arranjo periódico dos íons com diferentes estados de valência, dos cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} nas posições octaédricas da rede espinel de magnetita. O ordenamento destes íons abaixo de T_V provoca um aumento de resistividade elétrica, de até cem vezes em relação ao valor a temperaturas acima da transição. Além disso, o ordenamento de carga produz uma transição de fase estrutural de cúbica para ortorrômbica (Garcia & Subias 2004). Cristais ultrafinos de magnetita se transformam em maguemita, após anos, mesmo a temperatura ambiente (Murad & Schwertmann 1993).

A maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) possui estrutura similar à magnetita, e difere desta por possuir todos os íons Fe no estado trivalente e vacâncias. Entre os fatores que favorecem a oxidação da magnetita estão imperfeições cristalinas (Colombo *et al.* 1964), grande área superficial (Gallagher *et al.* 1968) e água adsorvida. A maguemita é ferrimagnética a temperatura ambiente, mas sua temperatura de Curie é difícil de ser estimada, pois este mineral transforma-se em hematita em temperaturas acima de 700 K. Os momentos atômicos nos sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B) são paralelos, mas antiparalelos quando se compara um sítio em relação ao outro.

As titanomagnetitas ($\text{Fe}_{3-x}\text{Ti}_x\text{O}_4$) são espinélios inversos. A temperatura de Curie diminui à medida que o parâmetro x aumenta. Esta temperatura é determinada através da comparação dos dados de difração de raios-X e medidas magnéticas. A não concordância entre os dados pode indicar a presença de impurezas tais como Al e Mg. Os valores da magnetização de saturação variam dependendo da composição deste mineral. A transição de Verwey é suprimida para $x > 0,1$ (Dunlop & Özdemir 1997).

A hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) romboédrica cristaliza-se na estrutura mostrada na **Figura II.2.3** com os íons oxigênio em uma estrutura hexagonal compacta. Os momentos magnéticos dos íons Fe^{3+} estão ferromagneticamente acoplados dentro de seus planos-c específicos, mas antiferromagneticamente acoplados entre os planos (Moskowitz 1991).

A hematita é paramagnética acima de $T = 965 \text{ K}$ (T_C), fracamente ferromagnética a temperatura ambiente e, a 260K (temperatura de Morin) sofre uma transição de fase para o estado antiferromagnético (Moskowitz 1991).

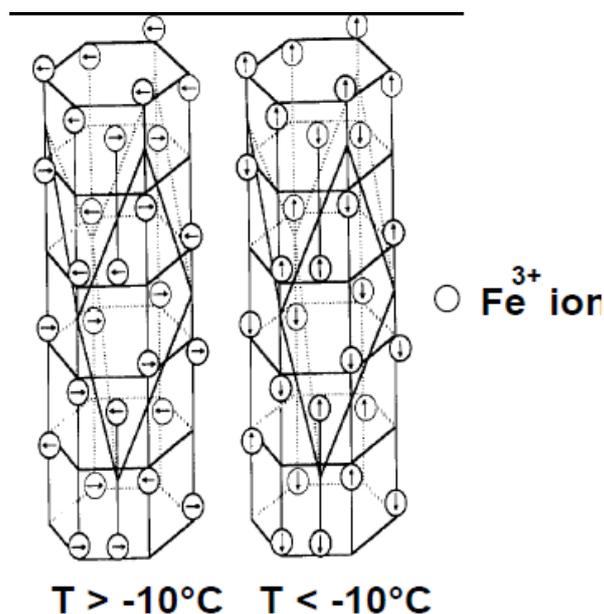


Figura II.2.3: estrutura cristalina da hematita (Moskowitz 1991). As setas indicam a direção do momento magnético dos íons Fe³⁺. Acima de -10° C, os momentos magnéticos são paralelos ao plano-c embora não estejam completamente alinhados, mas ligeiramente oblíquos, o que produz uma magnetização espontânea fraca de $\sigma_s=0,4$ emu/g. Abaixo de -10° C a direção do antiferromagnetismo muda e se torna paralela ao eixo c e a hematita torna-se um antiferromagneto perfeito.

A goetita (α -FeOOH) ortorrômbica é um constituinte comum de solos e sedimentos. A estrutura da goetita é baseada no arranjo dos átomos de oxigênio em um arranjo hexagonal compacto com os íons de Fe³⁺ ocupando metade dos sítios octaédricos. É um mineral antiferromagnético com temperatura de Neel, T_N , de 393K, porém a presença de impurezas pode diminuir este valor consideravelmente. Assim como a hematita, a goetita possui um ferromagnetismo superposto cuja temperatura de Curie coincide com T_N embora seja mais fraco que o da hematita (Moskowitz 1991).

3. Ressonância Ferromagnética e material magnético em insetos sociais

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma ferramenta poderosa para o estudo de íons paramagnéticos, como o Fe^{3+} (Meads & Malden 1975, Angel & Vincent 1978). Uma descrição detalhada da técnica pode ser encontrada em (Wertz & Bolton 1972). Em sistemas que possuem magnetização remanente, as interações dipolo-dipolo ou acoplamentos magnéticos podem levar a sinais intensos e largos a temperatura ambiente que não podem ser associados a uma fase magnética específica sem que haja ambigüidade (Griscom 1980, Gehring & Karthein 1990). Estas linhas largas são produzidas pela ressonância ferromagnética (RFM). Os princípios básicos da RFM são similares aos da RPE, onde o momento magnético da amostra interage com o campo aplicado (Kittel 1948, Bickford 1950). Uma descrição detalhada destes experimentos pode ser encontrada, por exemplo, em (Kittel 1948, Vonsovskii 1966). Na presença de um campo magnético, os momentos magnéticos precessam em torno da direção do campo com uma frequência ω . A frequência aumenta com o campo, de acordo com a lei de Larmor:

$$\omega = \gamma H \quad (\text{II.3.1})$$

com γ sendo a razão giromagnética e H o campo aplicado. As diferenças de energia observadas por RPE são predominantemente devido a interação de elétrons não pareados na amostra com um campo magnético aplicado (efeito Zeeman). O momento magnético do elétron interage com o campo que pode gerar dois estados de energia, um mínimo quando este momento está alinhado com o campo ($= -\mu H$) e um máximo quando este momento é antiparalelo ao campo ($= \mu H$). A absorção ocorre quando esta frequência se iguala à da radiação de microondas (ν). A condição de ressonância resultante pode ser escrita como:

$$h\nu = g\mu_B H M_S = (\pm 1/2) g\mu_B H \quad (\text{II.3.2})$$

e

$$h\nu = g\mu_B H \quad (\text{II.3.3})$$

supondo que não existe contribuição de campos de anisotropia. h é a constante de Planck, g ($= \gamma h/2\pi\mu_B$) é o fator giromagnético e μ_B o magneton de Bohr. A RFM é similar a RPE onde o momento magnético total da amostra interage com o campo aplicado, mas depende da forma do material e da orientação devido à contribuição do campo externo, H_E , campo de desmagnetização, H_D , e do campo de anisotropia, H_A (eq. II.3.4):

$$h\nu = g\mu_B H_{ef} = g\mu_B (H_E + H_D + H_A) \quad (\text{II.3.4})$$

Já que as anisotropias na fase ferromagnética criam campos internos que se adicionam ao externo, o campo efetivo (H_{efe}) é a soma do campo aplicado e dos campos internos.

Na ressonância, $H_{ef} = H_r$

$$H_r = h(\nu/g\mu_B) - H_D - H_A \quad (\text{II.3.5})$$

Griscom (1980) descreve as energias de anisotropia principais que podem influenciar H_{efe} . A anisotropia magnetocristalina é resultado da estrutura cristalográfica, enquanto a anisotropia de forma é causada pela interação do vetor magnetização com o campo de desmagnetização do grão. Para magnetita, a anisotropia de forma é dominante em partículas não esféricas com tamanho menor do que 20 μm , enquanto que para partículas grandes, a anisotropia magnetocristalina é dominante (Dunlop & Özdemir 1997). Para grãos de magnetita maiores a informação espectroscópica se origina das regiões da superfície e próximas à esta (Fischer *et al.* 2007, Griscom 1974). O espectro obtido nos espectrômetros é a derivada da curva de absorção. O campo de ressonância, H_r , é o valor do campo quando a absorção é máxima (derivada é nula). O valor de g_{ef} é definido como $g_{ef} = h\nu/\mu_B H_r$. $\Delta H_{1/2}$ é a largura a meia altura e ΔH_{pp} a largura pico-a-pico na derivada A_W é a razão entre as larguras obtidas à direita (ΔH_{CA}) e à esquerda (ΔH_{CB}) da curva de absorção. Ambos são obtidos de $y_{\text{máx}}/2$ no espectro integrado (Figura II.3.1). Os valores de g_{ef} , ΔH_{pp} e A_W podem dar informação sobre a intensidade e orientação de campos de anisotropia na

amostra, tamanho do cristal e composição para grãos monodomínio não interagentes (Weiss *et al.* 2004).

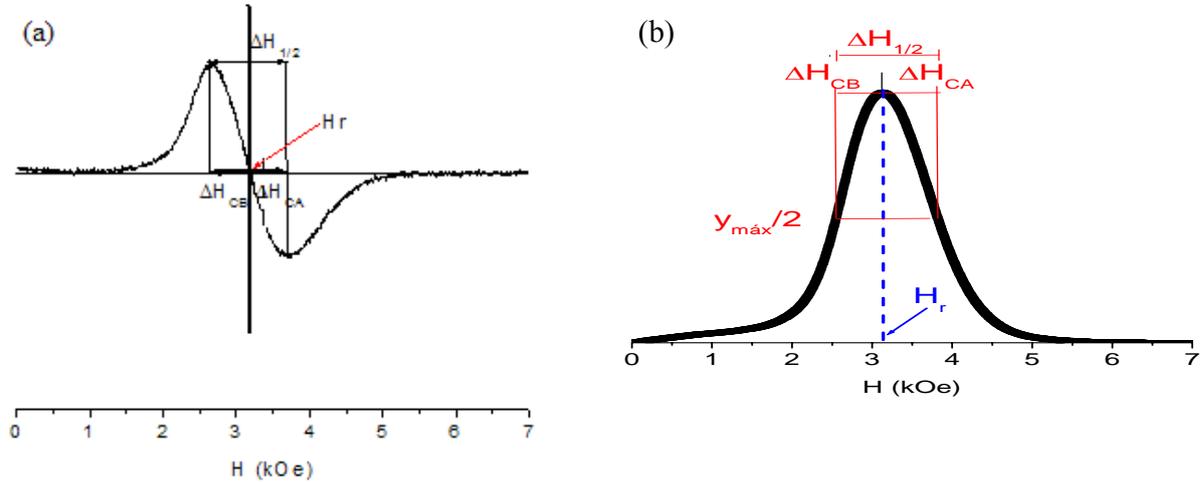


Figura II.3.1: Espectro de RFM derivada (a) e absorção (b) mostrando alguns parâmetros relevantes que podem ser obtidos.

Um modelo para a dependência linear do H_r com a temperatura foi proposto para partículas de magnetita dispersas em uma matriz copolímera mesoporosa (Morais *et al.* 2000) e magnetopolissomas e ferrofluidos de magnetita (Morais *et al.* 2005) na faixa de temperatura entre 100K e 250K. A dependência com a temperatura do H_r é principalmente associada a H_A , $H_A = 2K_{ef}/M_s$, onde K_{ef} é a densidade de energia de anisotropia efetiva e possui duas componentes: a maciça (K_B) e a de superfície (K_s)

$$K_{ef} = K_B + K_s \quad (\text{II.3.6}).$$

A componente de superfície é relacionada à razão superfície-volume por $K_s = (6/D) \cdot k_s$, onde D é o diâmetro da nanopartícula e k_s é a anisotropia de superfície. Em geral, K_{ef} e M_s dependem da temperatura. No entanto, considerando que os dados foram obtidos abaixo de T_C (850K), $M_s \sim 470$ Oe. A constante de anisotropia magnética efetiva pode ser representada empiricamente como:

$$K_{ef} = K_0 + k_{ef} * T \quad (II.3.7)$$

K_0 é uma constante e k_{ef} é um coeficiente dependente do diâmetro da partícula expresso em $\text{erg}/\text{cm}^3\text{K}$.

A variação térmica de H_r foi analisada considerando na eq II.3.5 para magnetita $\gamma = 1,87 * 10^7 \text{ Oe}^{-1}\text{s}^{-1}$, $g = 2,12$ e ω_r é a frequência de ressonância ($\sim 2\pi * 9,4\text{GHz}$) e, para partículas esféricas $H_D = (4\pi/3)M_s$. A dependência linear observada experimentalmente,

$$H_r = A + BT \quad (II.3.8)$$

é relacionada empiricamente a $A = \omega_r/\gamma - 2K_0/M_s - (4\pi/3)M_s$ e $B = 2k_{ef} / M_s$. A comparação entre (I.3.7) e (I.3.8), identifica $K_0 = K_B$ e $k_{ef}T = (6/D)k_s$. Logo, $k_{ef} \propto (6/D)$.

A variação térmica da largura de linha de ressonância (ΔH_{pp}) dada pela equação II.3.9 foi proposta para partículas de magnetita superparamagnéticas dispersas em uma matriz não magnética para temperaturas de 100K a 290K (Morais *et al.* 1987):

$$\Delta H_{pp} = \Delta H_{pp}^0 * \tanh (\Delta E/2k_B T) \quad (II.3.9)$$

onde $\Delta H_{pp}^0 = 5g\mu_B S n/D^3$ e $\Delta E = KV$ é principalmente associada a altura da barreira de energia magnética onde V é o volume da partícula. O pré-fator, ΔH_{pp}^0 , na equação II.3.9, é o produto do spin associado a cada centro magnético dentro da nanopartícula (S), o número de centros magnéticos por partícula (n) e a distância partícula-partícula na matriz. Esse modelo foi aplicado a larguras de linha obtidos por estudos de RPE em abdomens de abelhas *Apis mellifera* (Esquivel *et al.* 2001), cupins *Neocapritermes opacus* (Alves *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2008), e formigas *Pachycondyla marginata* (Wajnberg *et al.* 2000).

Esquivel *et al.* (1999) utilizaram a RFM à temperatura ambiente no estudo de materiais magnéticos em formigas *Solenopsis sp.* coletadas em Citrolândia, Rio de Janeiro e Venda Nova, Espírito Santo. Os espectros obtidos são compostos de diferentes linhas. A maioria dos espectros apresentou uma linha na região de $g = 4.3$ característica de íons de Fe^{+3} magneticamente isolados, spin $S = 5/2$, com vizinhança de baixa simetria (Yahiaoui *et*

al. 1994). Também foram observadas três linhas na região em torno de $g = 2$. Uma dessas linhas, estreita, está em geral relacionada a radicais livres resultantes de processos biológicos. A linha com uma estrutura de seis picos, foi associada a presença de íons de manganês (Mn^{2+}). Foi sugerido que a linha, mais intensa e mais larga, estaria relacionada à presença de partículas de magnetita de diferentes tamanhos.

As propriedades do material magnético encontrado no abdômen de formigas *Pachycondyla marginata* foram estudadas analisando-se a variação térmica das três componentes dos espectros de RFM (Wajnberg *et al.* 2000). A primeira, chamada de campo alto (CA), uma linha de ressonância larga na região de $g = 2$, foi relacionada à presença de nanopartículas magnéticas isoladas. A segunda, chamada de campo baixo (CB), identificada em valores de $g > 4$, foi relacionada à presença de cadeias lineares de nanopartículas magnéticas, agregados ou partículas maiores não esféricas. A terceira linha foi chamada de envoltória do Mn. Assumindo que o campo de anisotropia é o mesmo para as partículas associadas às linhas de campo alto e baixo e, que o valor do campo de desmagnetização (H_D) é dado pela diferença entre os campos de ressonância das linhas CA e CB, $H_D = 2033$ Oe, o campo de anisotropia H_A em função da temperatura foi obtido. O comportamento da largura de linha com a temperatura foi analisado, utilizando a eq II.3.9 para temperaturas acima de 70 K, e obteve-se para os resultados associados a linha HF, $\Delta H_R^0 = 1373 \pm 10$ Oe e $\Delta E/2k_B = 272 \pm 7$ K. Como a variação de K a altas temperaturas é desprezível, estimou-se um volume médio de $(1,2 \pm 0,1) \times 10^3$ nm³ e diâmetro de $13 \pm 0,4$ nm, supondo partículas isoladas de magnetita.

De forma semelhante, abdomens macerados de abelhas da espécie *Apis mellifera* foram estudados, porém a linha chamada de envoltória do Mn foi sugerida como associada ao óxido férrico FeOOH, um possível precursor de magnetita. Foram estimados volumes de 1×10^3 nm³ para as partículas isoladas em abdômens e 3×10^2 nm³ para as de abdomens liofilizados. Alves *et al.* (2004) estimou um diâmetro de $18,5 \pm 0,3$ nm para as partículas presentes em cupins da espécie *Neocapritermes opacus*, com K entre 2,1, 2,6 e $3,2 \times 10^4$ erg/cm³ para cabeça de cupins, e cupins orientados paralelamente e perpendicularmente ao campo aplicado. A correlação entre a segunda integral do espectro de RFM deste cupim, que é proporcional a quantidade de material magnético, e a magnetização de saturação,

após 4 dias de dieta a base de celulose foi mostrada indicando a eliminação do material magnético ingerido (Oliveira *et al.* 2005).

Estudos mais recentes de RFM e magnetometria SQUID foram realizados para identificar a parte do corpo que possuiria um possível magnetoreceptor, baseado em partículas magnéticas, como descrito na hipótese ferromagnética. Curvas de histerese a 300K das partes do corpo de formigas *Pachycondyla marginata* (Wajnberg *et al.* 2004) indicam que a maior contribuição na magnetização de saturação vem da antena, assim como foi encontrado nas abelhas sem ferrão *Schwarziana quadripunctata* (Lucano *et al.* 2006). Medidas das partes maceradas de formigas *Solenopsis interrupta* também identificaram maior quantidade de material magnético em cabeças com antenas (Abraçado *et al.* 2005). O estudo de material magnético por RFM nas três partes do corpo da formiga *Solenopsis substituta*, mostrou que a quantidade deste é maior na cabeça com antenas do que no abdômen com pecíolos (Abraçado *et al.* 2008). Por outro lado, em abelhas *Apis mellifera* (Chambarelli *et al.* 2008), e em cupins (Maher 1998, Alves *et al.* 2004) a maior quantidade de material foi encontrada no abdômen. De qualquer forma, mais importante do que a quantidade de material encontrado é saber de que forma este material está organizado dentro de uma estrutura sensorial de maneira a funcionar como um magnetoreceptor. Apesar das diferenças encontradas entre estas quantidades nas diferentes espécies, é provável que a cabeça e/ou a antena sejam partes onde é possível encontrar magnetoreceptores e sugerem que estudos mais detalhados devem focar estas partes do corpo nestes insetos.

4. Uso da microscopia para identificação de magnetoreceptores

Sensibilidade geomagnética e orientação magnética têm sido intensivamente estudadas em todos os grupos de animais (Gould 2008, Lohmann *et al.* 2008, Wiltschko *et al.* 2008), mas os mecanismos pelos quais os animais podem perceber o campo magnético e transduzir este sinal para o sistema nervoso ainda não foi identificado. A pesquisa em magnetorecepção está relacionada a duas hipóteses principais que se apóiam em dois princípios físicos fundamentalmente diferentes, mas não mutuamente exclusivos. A hipótese de pares de radicais supõe que a base para o sensor magnético está em uma classe especial de moléculas, os criptocromas, que sofrem reações químicas magneticamente

anisotrópicas (Ritz *et al.* 2000, Ritz *et al.* 2004, Maeda *et al.* 2008). Pássaros migratórios, por exemplo, parecem utilizar o mecanismo de par de radicais para a bússola de inclinação (veja I.1) e adicionalmente um sistema baseado em magnetita para o mapa navegacional (Wiltschko *et al.* 2008). Esta última, conhecida como hipótese ferromagnética, postula o envolvimento de material ferromagnético, isto é, magnetita biogênica acoplada a estruturas mecanossensíveis que transmitem a informação do campo geomagnético na forma de um torque ou força no sistema nervoso (Kirschvink & Gould 1981, Shcherbakov & Winklhofer 1999). A partir da observação de partículas superparamagnéticas outros modelos foram desenvolvidos (Davila *et al.* 2003, Davila *et al.* 2005). O primeiro passo para confirmar esta hipótese é através da demonstração da presença de nanopartículas magnéticas dentro ou em torno de estruturas inervadas dentro dos tecidos animais (Diebel *et al.* 2000, Fleissner *et al.* 2003).

A descoberta da bactéria magnetotática (Blakemore 1975) foi um marco para a hipótese da magnetita. Cadeias intracelulares de cristais de magnetita monodomínio biomineralizadas e arranjadas em cadeias paralelas ao eixo de motilidade destes microorganismos fazem com que estas bactérias se orientem passivamente ao longo das linhas de campo geomagnético, levando-as a ambientes ricos em nutrientes e pobres em oxigênio. Partículas magnéticas foram encontradas em tecidos específicos ou em extratos de partes do corpo de animais (O'Leary *et al.* 1981, Vilches-Troya *et al.* 1984, Mann *et al.* 1988, Walker *et al.* 1997, Diebel *et al.* 2000, Hanzlik *et al.* 2000), mas somente na truta rainbow *Oncorhynchus mykiss* (Walker *et al.* 1997) e nos pombos correio (Hanzlik *et al.* 2000, Fleissner *et al.* 2003) a magnetita encontrada parece ter uma conexão neural direta. O estudo dos efeitos do campo magnético no comportamento de insetos, inicialmente e extensivamente na abelha *Apis mellifera* e a posterior detecção de uma remanência de $1,2 \cdot 10^6$ emu em abdômens deste inseto (Gould *et al.* 1978) motivaram a busca de um sistema magnetoreceptor baseado na presença de partículas de magnetita (Gould *et al.* 1978, Schiff 1991, Hsu *et al.* 2007). Diversos autores demonstraram que o ferro se deposita dentro de trofócitos (células) do corpo gorduroso de abelhas (Kuterbach & Walcott 1986, Hsu & Li 1993, Hsu & Li 1994, Hsu *et al.* 2007), e vespas (Walcott 1985, Hsu 2004). De acordo com (Kuterbach & Walcott 1986), os grãos de ferro encontrados diferem em sua estrutura e composição daqueles encontrados em outros sistemas

biológicos: não são cristais de magnetita, mas partículas que contêm ferro, oxigênio, cálcio e fósforo em um arranjo não-cristalino. Além disso, os grãos estão aparentemente aleatoriamente distribuídos dentro do citoplasma das células e, não estão associados a nenhuma organela em particular. Posteriormente, Hsu e Li (1993, 1994) observaram a mesma região já analisada por Kuterbach e Walcott (1986) e afirmaram terem encontrado magnetita superparamagnética dentro dos trofócitos, e argumentaram que estas células eram invadidas e estavam ligadas ao citoesqueleto. No entanto, alguns autores criticaram seus resultados: Kirschvink e Walker (1995) e Nesson (1995) discordaram do fato dos autores terem encontrado magnetita superparamagnética, enquanto Nichol e Locke (1995) não encontraram inervações ou ligações citoesqueléticas associadas às células do corpo gorduroso e acreditaram que Hsu e Li negligenciaram o papel do metabolismo do ferro em suas análises. O corpo gorduroso é conhecido por ser um órgão responsável pela estocagem de comida, intermediando o metabolismo em insetos (Cruz-Landim & Mello 1981) e tem a habilidade de acumular e seqüestrar ferro provavelmente trabalhando na manutenção da homeostase deste elemento (Kuterbach & Walcott 1986). As críticas aos resultados encontrados por Hsu e Li (1994) não favorecem a hipótese do abdômen de abelha *Apis mellifera*, especificamente na região do corpo gorduroso, como magnetosensor. Keim *et al.* (2002) observaram estes mesmos grãos ricos em ferro do corpo gorduroso de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* e encontraram os mesmos resultados obtidos por Kuterbach e Walcott (1986). Os autores propuseram neste trabalho uma origem para as partículas contendo Fe, Ca e P encontradas. Para eles as partículas são compostas por formas degradadas de holoferritina e o fósforo e cálcio são componentes do meio dentro do retículo endoplasmático que precipita com os componentes do núcleo da ferritina. O artigo de Hsu *et al.* (2007) reafirma a existência de magnetita superparamagnética nos grãos de ferro encontrados nos trofócitos da *Apis mellifera*. Um dos argumentos utilizados para assegurar esta afirmação é a presença de uma possível membrana circundando alguns dos grãos de ferro purificados dos trofócitos que foi associada à membrana de bicamada lipídica encontrada nos magnetossomos de bactérias magnéticas. Existe a possibilidade, no entanto, de que o material encontrado circundando as partículas encontradas seja provavelmente um artefato, provavelmente resto de matéria orgânica oriunda do processo de extração. Distintas técnicas foram utilizadas para caracterizar os grãos puros obtidos, no

entanto um padrão de difração de elétrons não foi obtido, impossibilitando a identificação de magnetita como cristal presente na amostra. Ao invés disso, medidas magnéticas e espectroscópicas foram utilizadas para confirmar os resultados obtidos em (Hsu & Li 1993, Hsu & Li 1994). De qualquer forma é importante destacar que, Hsu et al. (2007) observaram que, sob aplicação de campos magnéticos, mudanças no tamanho dos grãos magnéticos nos trofócitos e liberação de íons de cálcio ocorriam, sugerindo que os grãos presentes nos trofócitos estão envolvidos no processo de magnetorecepção.

O efeito da mudança de polaridade da componente horizontal do campo magnético na frequência de disparo dos neurônios do abdômen de abelhas foi mostrado através do registro da atividade espontânea de neurônios no segundo gânglio abdominal (Schiff 1991). Material elétron-denso foi encontrado nos pelos duros e, foram denominados como prováveis magnetita monodomínio (SD) e superparamagnética (SPM). Com base nestes resultados, foi proposto que estas partículas poderiam atuar como um amplificador das mudanças da indução magnética externa que influenciariam elementos neuronais restritos às regiões próximas às partículas presentes. Estes grânulos elétron densos de 10-20 nm de diâmetro, sugeridos como de magnetita SPM, foram encontrados ao longo de um lado e na base de pelos formando anéis em torno dos dendritos, presentes em um grande número em abelhas. No entanto, para a confirmação de que o material encontrado é mesmo magnetita, seria necessário verificar a presença de ferro e oxigênio através da análise por espectroscopia de raios-x dispersiva em energia (EDS) ou espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS) e o cálculo dos espaçamentos interplanares, obtidos através de um padrão de difração. Além das partículas pequenas, estruturas cristalinas hexagonais com 300 nm de comprimento foram observadas, espalhadas através dos tecidos cuticulares e camadas abaixo. Foi sugerida a presença de uma membrana circundando estas partículas maiores, mas a imagem mostrada (Figura II.4.1) sugere um efeito de imagem “super focada” (overfocused). A presença de contaminantes, especialmente na região próxima a superfície, pode ser considerada.

A busca por um sistema magnetoreceptor foi estendida a outros insetos. Partes do e todo o corpo de duas espécies de cupins (*Nasutitermes exitiosus* e *Amitermes meridionalis*) foram medidos. Medidas magnéticas indicaram a presença de concentrações muito pequenas de material magnético, com maior quantidade encontrada no tórax e abdômen

quando comparada à cabeça. Antes das medidas, os cupins foram alimentados com celulose pura, por pelo menos três dias, para eliminar material magnético ingerido de seus intestinos. Os cupins também foram lavados em água duplamente destilada, para eliminar material magnético aderido do solo. Os extratos magnéticos de ambas espécies foram utilizados para análises por microscopia eletrônica (Maher 1998). O cupim *Neocapritermes opacus* também foi submetido a uma dieta de celulose e observou-se um decréscimo na quantidade de material através dos dias (Oliveira *et al.* 2008).

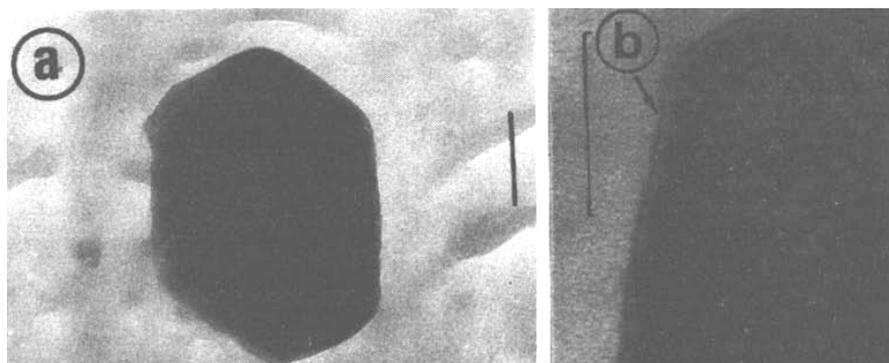


Figura II.4.1: Partícula encontrada na camada dorsal, ventral ou frontal da abelha *Apis mellifera*. A autora menciona a visualização da membrana já na figura (a). A mesma figura, com outra magnificação, está mostrada em (b) e a seta indica a região onde a possível membrana é visualizada. Barra de escala: 0,1 μm .

Os cupins não puderam resistir mais de quatro dias fora de seu ambiente natural sob esta condição de dieta e não foi possível concluir se o material ingerido foi completamente excluído. A melhor possibilidade de se ver livre da contaminação do trato digestivo seria, neste caso, a remoção do sistema digestivo deste inseto e a comparação destas medidas com insetos com sistema digestivo intacto. Mesmo o processo de limpeza também não garante a remoção completa das partículas do solo.

Maher (1998) utilizou microscopia eletrônica de transmissão (MET) para identificar o tamanho e forma das partículas extraídas magneticamente, sugeridas como magnetita. Aglomerados de material elétron-denso ultrafino foram encontrados nestes extratos e partículas com diâmetros de 10 nm, em média, com morfologias cúbicas e hexagonais com distribuição estreita de tamanhos dos cristais. Baseada nestas características e na

distribuição larga de partículas do solo, concluiu sobre a biogenicidade das partículas extraídas do cupim, embora tenha analisado as partículas do solo Rendzina, UK e não do local de coleta dos cupins. Nenhuma análise espectroscópica, para identificar os elementos Fe e O, ou difração de elétrons de área selecionada, para identificar a fase cristalina, foram feitos.

Slowik e Thorvilson (1996) aplicaram o método de contrastação do azul da Prússia para identificar regiões de concentração de Fe(III) nos abdomens de operárias pequenas, médias e grandes, rainhas e alados da espécie de formiga *Solenopsis invicta*. Partículas contendo ferro não foram consistentemente encontradas em cabeças, tórax, rainhas e alados. A consistência e quantidade de ferro encontrados em cada casta foram associadas às atividades desenvolvidas por cada grupo. As operárias grandes, que possuem a maior quantidade de ferro encontrado, desenvolvem tarefas do lado de fora e longe do ninho. Portanto, um sistema magnético sensor poderia ser utilizado para sua orientação. Não foi verificada a distribuição destes grãos de ferro na região subcuticular do abdômen nem discutida a possibilidade do material encontrado ser resultado de metabolismo.

Acosta-Avalos *et. al* (1999) extraíram partículas magnéticas das partes do corpo (cabeça, tórax e abdômen) da formiga *Pachycondyla marginata* usando métodos de precipitação magnética. O procedimento de isolamento consistiu na maceração em presença de hipoclorito de sódio (NaOCl) 5%, para remover a matéria orgânica, e passos de centrifugação, sonicação e concentração magnética com um ímã Sm-Co. Partículas contendo ferro foram identificadas através de imagens elétron espectroscópicas e padrões de difração de elétrons foram obtidos. Uma distribuição de tamanhos bimodal na cabeça e tórax foi sugerida pelos autores. Foi encontrada maior quantidade de material no abdômen do que em outras partes, provavelmente devido à acumulação de minerais ingeridos no trato digestivo, enquanto as nanopartículas extraídas da cabeça podem ser derivadas de processos de biomineralização e/ou contaminação cuticular (Acosta-Avalos *et al.* 1999).

Análises espectroscópicas mostraram que alguns cristais eram compostos de Fe e O. Os padrões de difração foram obtidos de alguns destes cristais agregados, no entanto, a identificação de uma única fase cristalina não foi possível. Foi considerada a presença de mistura de óxidos, magnetita/maghemita, além de hematita (0,366) ou goetita (0,259; 0,253; 0,249; 0,245; 0,230). Como sugerido para maguemita, a presença de hematita e

goetita pode também ter origem pela ação do oxidante NaOCl na magnetita (Towe 1985), dependendo do tempo de reação. Não se pode descartar a possibilidade de contaminação por partículas magnéticas do solo. Não é possível determinar se as partículas são biomineralizadas e se elas estão envolvidas na magnetorecepção, também devido às restrições do método de extração. No entanto, este método pode ser utilizado como uma primeira aproximação na detecção de partículas magnéticas em um organismo.

Outras hipóteses para possíveis órgãos magnetorreceptores em insetos vêm surgindo através dos anos. Slowik e Thorvilson (1996) sugerem que as partículas encontradas em cabeças de formigas podem estar envolvidas na magnetorecepção de maneira similar ao do modelo proposto para abdômen de abelhas (Gould *et al.* 1978). Medidas magnéticas nas partes individuais (cabeça, antena, abdômen e tórax) da formiga *Pachycondyla marginata* mostrou que a antena apresenta o sinal magnético mais intenso (Wajnberg *et al.* 2004). Além disso, experimentos comportamentais feitos com a formiga *Myrmica ruginodis* mostraram que a antena responde a campos magnéticos com o pedicelo sendo a parte da antena mais influenciada (Vowles 1954). Baseado nestes resultados, neste trabalho, microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) foram usados, pela primeira vez, para identificar um possível magnetosensor na antena, um órgão sensorial promissor para magnetorecepção. Ressonância ferromagnética foi utilizada para identificar diferenças individuais e/ou entre as partes do corpo da formiga e variação térmica foi feita para verificar as propriedades magnéticas do material e compará-los, quando possível, com os resultados obtidos anteriormente.

Capítulo III

Material e métodos

Formigas operárias *P. marginata* foram coletadas na mata de Santa Genebra, Campinas, São Paulo (22 ° 49' S, 47 ° 06' W). As coletas foram realizadas em diferentes datas e analisadas por técnicas distintas, conforme mostrado na [tabela III.1](#).

Coleta	RFM	Extração magnética	Azul da Prússia	Azul de Turnbull	MEV	Cortes ultrafinos para MET
Abril/06			X	X	X	X
Set/06	X	X	X	X		X
Mai/07		X				X
Fev/08			X		X	X

Tabela III.1 : todos os tipos de medidas realizadas em amostras de coletas distintas. RFM – ressonância ferromagnética, MEV – microscopia eletrônica de varredura, MET – microscopia eletrônica de transmissão.

As formigas foram identificadas através de suas características morfológicas e hábitos alimentares. Este inseto alimenta-se exclusivamente da espécie de cupim *Neocapritermes opacus*, e as operárias que foram coletadas para este trabalho estavam atacando ninhos ou transportando estes insetos para seus próprios ninhos, exceto na coleta de Abril06 onde operárias que limpavam o ninho também foram coletadas.

Os métodos e técnicas utilizadas para cada uma das coletas são descritos abaixo:

1. Medidas de Ressonância ferromagnética (RFM)

Os espectros foram obtidos com o espectrômetro banda-X, modelo ESP 300E (Bruker). Para medidas de variação térmica utilizou-se um criostato de fluxo de hélio líquido ESR 900 (Oxford) com um controlador de temperatura ICT4 (Oxford). As

temperaturas foram medidas com um termopar AuFe versus Cromel localizado abaixo da amostra.

A cavidade e os tubos de quartzo são medidos a fim de identificar possível contaminação. O sinal de fundo, ou o sinal característico da cavidade é subtraído do sinal das amostras.

Os parâmetros H_r , ΔH_{pp} (I.3) foram obtidos usando o programa Origin[®]. A segunda integral da derivada da absorção (área da absorção), S , foi calculada utilizando-se o programa WINEPR. Este programa considera o primeiro ponto do espectro com intensidade nula. O espectro das antenas, dependendo da quantidade medida apresenta uma componente que se estende a campo zero, resultando em valores negativos da integral. Portanto, para fins de comparação somente os espectros de antena sem contribuição negativa para a integral do winepr foram utilizadas. Para estas medidas, formigas que atacavam um ninho do cupim *Neocapritermes opacus*, provavelmente forrageadeiras (60 indivíduos), foram coletadas, transportadas vivas, em caixas contendo solo da vizinhança e do próprio ninho. Esta coleta foi realizada em setembro de 2006 (Set06). As formigas foram mantidas em uma caixa contendo solo até o momento das medidas.

1-i) medidas do solo

Dois grupos de amostras de solo obtidos da caixa (~ 15 cm x 20 cm) onde as formigas estavam vivendo, dentro do laboratório de biofísica do CBPF foram medidos em dias distintos. O primeiro grupo (G1) consistiu de uma amostra de 1g de solo retirado da caixa, que foi medido e, sucessivamente dividido em 4 amostras de 0,5g, 0,250g, 0,125g e 0,100 g e, 0,01 g de extrato magnético foi obtido da amostra de 0,100 g utilizando-se um imã Sm-Co. O segundo grupo (G2) consistiu de outras cinco amostras de 0,0016 g retiradas de distintas regiões da caixa. Medidas a temperatura ambiente foram feitas com os dois grupos de amostras e as de variação térmica, de 5 a 300K, foram feitas em duas amostras de solo, do segundo grupo, utilizando os seguintes parâmetros: potência de microondas (pmw) de 4 mW e amplitude de modulação (A_m) de 2,02 G.

1-ii) Diferenças individuais

Duas medidas a temperatura ambiente de cada uma das 47 formigas que foram encontradas mortas em seu “novo” ninho e das quatro formigas vivas (i.e, mortas minutos antes das medidas) foram realizadas para avaliar as diferenças na intensidade e parâmetros dos espectros de cada indivíduo, totalizando 102 medidas. H_r , ΔH_{pp} e S foram utilizados como parâmetros de comparação. As formigas foram orientadas com o eixo longo do corpo perpendicular ao campo magnético (Figura III.1.1).

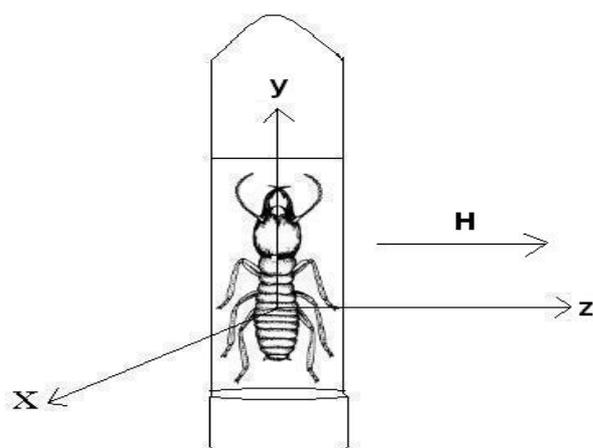


Figura III.1.1: Orientação do inseto com o eixo longo do corpo (y) perpendicular ao campo magnético (H, paralelo ao eixo z).

Os espectros foram obtidos com pmw de 4 e 10 mW, 1 e 3 varreduras (s) e A_m de 2,01 G. Algumas amostras foram remedidas em um intervalo de dois dias para verificar a estabilidade da intensidade do sinal.

1-iii) Remoção de contaminantes da cutícula das formigas

As formigas coletadas foram divididas em dois grupos, vivas e mortas. Cada grupo foi dividido em quatro: lavados com água, com etanol 70%, com e sem sonicação (total: 8 grupos). O parâmetro S foi utilizado para avaliar a eficiência da limpeza dos 4 procedimentos.

1-iv) Medidas das partes

Após 1-ii) e 1-iii) todas as formigas foram separadas em cabeça, antenas, tórax, abdômen e pernas e submetidas à nova sonicação em etanol 70%. Estas partes, foram mantidas agrupadas de acordo com o método de lavagem anterior e medidas, desde uma unidade até o número máximo possível na altura da cavidade. Mediu-se o total de 52 abdomens, 48 cabeças, 55 tórax e 312 pernas, com pmw de 4mW e com 1 varredura. 92 antenas foram medidas com 4, 10 ou 20 mW e com 1 ou 4 varreduras. Estas antenas foram divididas em escapos (88) e flagelos (92) que foram medidos separadamente, utilizando-se os mesmos parâmetros das antenas. A diferença na quantidade de partes deve-se à perda de amostras durante o processo de corte.

Foram realizadas medidas de variação térmica, de 5 a 300K, de escapos, flagelos, pernas e seus respectivos extratos.

2. Extração magnética

Extração magnética foi realizada em amostras coletadas em setembro de 2006 (Set06) e maio de 2007 (Maio07). Existem algumas diferenças no processo de preparação dos dois grupos de amostras que foram otimizadas para o segundo grupo. As amostras Set06 foram coletadas e medidas conforme descrito em “medidas de ressonância ferromagnética”, neste capítulo. Após as medidas de RFM, partes do corpo da formiga *P. marginata* foram utilizadas para extração magnética. A extração foi feita segundo o protocolo descrito em Acosta-Avalos *et al.* (1999): cada parte das formigas foi macerada, separadamente na presença de NaOCl 5% com separação visual da cutícula quando possível. Quantidades aproximadamente iguais de cada parte isolada foram postas em tubos de eppendorf até a metade destes (~1.5mL). A outra metade foi preenchida com NaOCl 5% e a mistura foi deixada na geladeira por uma noite. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 15700g por 8 minutos para precipitar o material insolúvel. O sobrenadante, constituído de matéria orgânica dissolvida, foi descartado e adicionou-se mais 0,75 mL de NaOCl. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso com ultra- som por 15 minutos, seguido da colocação de um ímã samário-cobalto (Sm-Co) na parede do eppendorf por 10 minutos, onde o material magnético fica, então, concentrado. O precipitado vermelho/laranja resultante é parcialmente removido com o sobrenadante e concentrações magnéticas

sucessivas são feitas para reduzir o precipitado a um mínimo de material. O material isolado pode conter quantidade considerável de gordura, visível como uma massa branca, portanto, todo o procedimento foi repetido, utilizando-se clorofórmio ao invés de NaOCl, até que esta massa não fosse mais observada a olho nu. O material insolúvel foi lavado em água destilada e precipitado por centrifugação e mantido a 4°C. Os mesmos procedimentos de centrifugação, sonicação, e concentração magnética foram aplicados a duas amostras de solo. A concentração magnética do solo resultou em um material negro concentrado na parede do eppendorf. Somente o solo, livre de parte do material magnético, foi analisada no MET.

Para as amostras Maio07, 50 formigas livres de solo foram coletadas e imersas em etanol 70%. Estas amostras foram divididas em cabeça, tórax, abdômen, antena e pernas e sonicadas, 4 vezes, em intervalos de 15 minutos. O procedimento de extração descrito para a coleta Set06 foi realizado utilizando-se somente hipoclorito de sódio e água destilada e, o processo, repetido três vezes cada.

Imediatamente antes das medidas as soluções foram sonicadas e concentradas magneticamente. Nas amostras obtidas de partes de inseto, uma pipeta foi colocada na posição do ímã, na lateral do eppendorf, para retirar o material acumulado naquela região. Uma gota de cada uma destas amostras foi depositada em grades de cobre, mesh 300, recobertas com filme de carbono (hidrofóbicas). Para torná-las hidrofílicas, elas foram expostas a um plasma de Argônio em um metalizador por 30 s. O precipitado da antena não foi observado a olho nu, portanto utilizou-se uma ponta magnética para misturar a solução e, a gota aderida a esta ponta foi posta na grade. Os cristais de NaCl que porventura estivessem presentes foram eliminados pela imersão desta mesma grade em uma seqüência de gotas d'água.

As imagens de campo claro e os padrões de difração de elétrons de área selecionada foram obtidos a 100 kV com um microscópio eletrônico de transmissão (MET) Jeol JEM 100 CX (Universidade Técnica de Munique).

3. Preparação de amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

2 cabeças de operárias com antenas (Set06) e 1 cabeça com antena e 1 antena (Fev08) de formigas *Pachycondyla marginata* em etanol 70% foram secas à temperatura ambiente e recobertas por ouro em um metalizador. As amostras Set06 foram medidas em um MEV JSM-5800 LV equipado com um sistema EDS Noran para espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (Instituto Militar de Engenharia, IME), enquanto as amostras Fev08 em um MEV JSM-5900 (Technische Universitaet Muenchen).

4. Preparação de amostras para microscopias óptica e eletrônica de transmissão (MET)

Os procedimentos utilizados para cada uma das coletas foram sendo aperfeiçoados até que se chegasse a melhor condição possível para observação destas amostras. As formigas possuem um exoesqueleto extremamente duro que dificulta a penetração dos reagentes normalmente utilizados em MET. Por esta mesma razão, optou-se pelo protocolo de MET para as amostras a serem observadas em microscopia óptica ao invés da técnica de inclusão em parafina (Haddad *et al.* 1998). Preparações distintas foram utilizadas para amostras coletadas em abril/06 (Abril06), setembro/06 (Set06), maio/07 (Maio07) e fevereiro/08 (Fev/08) e as mesmas serão descritas a seguir:

- Coleta de formigas e fixação

Abril06: formigas que estavam limpando o ninho foram imediatamente imersas e permaneceram 70 horas em uma solução fixadora glutaraldeído (GA) 2,5% + paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio (CACO) 0,1 M. As cabeças com antenas das amostras imersas na solução fixadora foram separadas do corpo e cortadas longitudinalmente. Logo após foram lavadas 3x em intervalos de 15min em tampão CaCO 0,1 M, e mantidas nesta solução por uma semana (CBPF).

Set06: cinco formigas forrageadoras vivas foram postas no congelador e, quando nenhum movimento foi observado as mesmas foram retiradas, as cabeças foram separadas do corpo e, divididas longitudinalmente em ½ cabeça + escapo e flagelo. Estas partes foram

lavadas em etanol 70% postas no ultrassom por 5 minutos para eliminar partículas de solo que poderiam estar presentes na superfície da cutícula. As amostras foram secas à temperatura ambiente por 3 horas e foram posteriormente fixadas em solução de Karnovsky, (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2% em tampão CaCO 0,1 M), por 48 horas. Foram lavadas três vezes em tampão CaCO 0,1, tendo as lavagens intervalos de 24, 12 e 30 horas, respectivamente.

Maio07: Amostras que foram imersas em glutaraldeído 2,5% em tampão CaCO 0,1 M desde maio07 foram divididas, em dezembro deste mesmo ano, em três partes: cabeça + ½ do escapo, a outra ½ do escapo + pedicelo + 3º ou 4º segmentos e o resto do flagelo que foram mantidos a 4º C, por 12h em tampão cacodilato de sódio. Após estes período, cinco lavagens de 10 minutos em tampão CaCO 0,1M foram feitas. O protocolo utilizado para estas amostras é o descrito para o nematóide *C. elegans* (Hall 1995), sem incluir o passo intermediário, após a desidratação, com óxido de propileno.

Fev08: formigas foram coletadas e trazidas vivas para o laboratório em um pote de plástico sem terra. As formigas foram lavadas em etanol 70% e foram sonicadas por 5 ou 10 min. Após a lavagem a cabeça foi separada do resto do corpo e dividada em duas partes. ½ cabeça + parte do escapo, parte do escapo+pedicelo+3º segmento e o resto do flagelo, foram imersos, logo após os cortes, em solução paraformaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em tampão CaCO 0,1M. Seguiu-se o protocolo de preparação para nematóides *C. elegans*, descrito em (Hall 1995).

- ***Pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão CaCO 0,1 M e lavagens em tampão CaCO 0,1 M***

Abril06, Set06: O tempo de pós-fixação das amostras foi de 40 minutos seguidos de três lavagens em intervalos de 15 minutos.

Maio07, Fev08: o tempo de pós-fixação foi o mesmo utilizado para as amostras preparadas anteriormente, seguida de três lavagens em intervalos de 20 minutos.

- *Desidratação e inclusão em resina*

Abril06: a desidratação das amostras foi feita com concentrações crescentes (v/v) de etanol em séries de 15 min, a partir de 35% (v/v). Após as duas últimas séries de 15 minutos a uma concentração de etanol de 100% (v/v), utilizou-se resina spurr para inclusão. O etanol não é imediatamente substituído pela resina, mas em proporções crescentes do spurr em relação ao etanol. As proporções utilizadas de etanol: spurr foram de 3:1, 2:1, 1:1 e 100% de resina spurr em intervalos de 24h. Logo após, a resina foi colocada em uma fôrma de silicone, e as amostras orientadas e mantidas em estufa a 70°C por 48h (UFRJ). Algumas amostras emblocadas foram submetidas à trimagem, utilizando-se uma lupa com uma base e uma lâmina de barbear. Cortes semi-finos (0,5 µm) foram feitos no micrótomo RM 2165 da Leica e cortes ultra-finos (90 nm) para microscopia eletrônica de transmissão no ultramicrótomo Ultracut UCT da Leica, com faca de diamante. A trimagem, os cortes e as medidas em MET (Phillips CM 100) foram feitas no centro de microscopia eletrônica na UNESP/Botucatu.

O mesmo procedimento foi aplicado a um grupo de amostras, com data de coleta desconhecida, para familiarização dos métodos de processamento para MET. Estas amostras não foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio e ½ cabeças + antenas ou somente antenas foram emblocadas em resina epoxy, comumente chamada de EPON. Cortes semi-finos destas amostras foram obtidos para observação em microscopia óptica.

Set06: O procedimento de desidratação e inclusão é o mesmo utilizado para as amostras Abril06, sendo distintos os intervalos de infiltração da resina. Os intervalos etanol:SPURR para esta amostra foram: 2:1 (24h), 1:1 (48h), 1:2 (24h) e 100% spurr por 18h.

Mai07: Para evitar que as antenas fossem emblocadas coladas na parede da resina spurr, ou mesmo, para uma melhor orientação das mesmas, cubos de agarose de baixo ponto de fusão, solução 2,5%, foram preparados e as amostras foram inseridas no mesmo. Este método também evita que amostras sejam pipetadas nos passos posteriores. Após a obtenção dos blocos de agarose contendo as amostras, seguiu-se o procedimento de

desidratação e inclusão das amostras de Abril06, sendo o último passo da desidratação, em etanol 100%, feito três vezes.

Fev08: as amostras foram inseridas em cubos de agarose desidratadas como descritas em Maio07. No estágio de pós-desidratação substituiu-se o solvente de transição, óxido de propileno, por acetona, acetonitril ou acetonitril+vácuo (dessecador). O acetonitril possui as mesmas propriedades do óxido de propileno com a vantagem de não ser extremamente tóxico.

Após a desidratação em etanol em séries de 30, 50, 70, 90 e 100% (duas vezes), em intervalos de 15 minutos, as amostras foram separadas em grupos e colocadas em acetona ou acetonitril 100% (três vezes) em séries de 10 minutos. Se seguiu a infiltração com acetona/acetonitril: kit de baixa viscosidade da AGAR (substituto do SPURR): 2:1 (24 horas), 1:1 (24 horas), 1:2 (72horas) e 100% de resina por 24h. As amostras foram então colocadas em uma fôrma de silicone e postas na estufa a 60° C por 48 horas.

Para se evitar a perda de tecidos, que poderiam ser observáveis, utilizou-se grades com uma única fenda, que permite a observação de cortes em série.

Após a trimagem, as amostras foram posicionadas no ultra micrótomo (Ultracut UCT da Leica / UNESP-Botucatu ou Reichert Jung/TUM-Munich) para a realização de cortes ultra-finos. Para que isso fosse possível a amostra e a faca deveriam estar corretamente alinhadas uma em relação à outra. Primeiramente, a faca e a base inferior da face da amostra que será cortada são posicionadas paralelamente. Quando se movimenta a amostra e a mesma se encontra próxima à faca é possível observar uma linha (sombra) que se movimenta no sentido contrário ao da amostra. Quando a amostra está corretamente orientada, toda a sombra se move sem que a largura da mesma se altere, o que garante cortes completos e uniformes sem o risco de danificar a faca e/ou a amostra.

Cortes ultrafinos seriais (100-200 nm) foram obtidos das seguintes amostras, nas seguintes orientações:

- Set/06: ½ cabeça + escapo + pedicelo + 3° segmento (1) orientada transversalmente à antena.

- Maio/07: ½ escapo + pedicelo + 3º segmento (2) orientadas longitudinalmente ao escapo e oblíquo aos segmentos

- Fev/08: ½ escapo + pedicelo + 3º segmento (4), sendo:

- 2 em acetona, orientadas transversalmente aos segmentos

- 1 em acetonitril, orientadas obliquamente aos segmentos

- 1 em acetonitril + vácuo, orientadas transversalmente/obliquamente aos segmentos.

Padrões de difração de elétrons de área selecionada (SAED, em inglês) e imagens de campo claro do 3º segmento até a cabeça a 100 kV com um MET Jeol 100 CX ou a 120 kV com um Jeol 2000 FX equipado com um sistema EDAX Phoenix para espectroscopia de raios-x dispersiva em energia (EDS), com resolução de 128-130 kV foram feitos. A abertura mínima disponível que permitiu calcular um padrão de difração de um único cristal é de 20 µm, no Jeol 2000 FX, enquanto a abertura máxima disponível era de 300 µm. Os dois microscópios possuem sistemas distintos de gravação de imagens: a revelação em filmes fotográficos com resolução de 300 linhas/mm é utilizada no Jeol 100 CX, enquanto uma câmera CCD com resolução de 1024 X 1024 ou 512 X 512 pixels no Jeol 2000 FX.

5. Otimização do protocolo de preparação de amostras

A preparação de amostras biológicas para microscopia ótica e eletrônica, especialmente transmissão, é extremamente importante. Durante todo o período em que amostras foram sendo observadas pequenas mudanças no método de preparação foram sendo implementadas, devido à extrema especificidade da amostra. Tentativas para conservação do tecido biológico foram feitas primeiramente para manter a matriz biológica, que sustentaria as partículas de óxidos de ferro, intactas, garantindo assim a reprodutibilidade das medidas magnéticas. Tal método não pôde assegurar tal efeito, já que a quantidade de material magnético encontrada em cada indivíduo e sua distribuição parece variar, especialmente quando se leva em consideração fatores como a casta.

Para fixação das amostras glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e solução fixadora de Karnovsky foram testadas. Uma dificuldade no processo de

conservação do tecido está relacionada à penetração destas substâncias nas amostras de formigas, que possuem cutícula extremamente resistente. Protocolos (Isidoro *et al.* 1998, Isidoro *et al.* 2000) mencionam o uso de KOH para remoção do exoesqueleto de insetos. No entanto, tal método não foi utilizado devido ao risco de perda de tecidos da região próxima à cutícula. As antenas da formiga estão cobertas de pelos sensores e as células sensoriais localizam-se logo abaixo da cutícula, na epiderme. Portanto, optou-se por uma otimização do método de preparação de amostras através da mudança ou controle no uso das substâncias químicas e tempo de permanência maior ou menor nestas soluções, entre outras adaptações. Procedimentos para preparação de amostras biológicas estão descritos, por exemplo, em (Haddad *et al.* 1998, Bozzola & Russel 1999). O fixador visa garantir a preservação dos tecidos, como se o organismo estivesse vivo, portanto, as amostras devem ser imersas tão rapidamente quanto possível na solução fixadora. Para as formigas, pedaços pequenos, com tamanhos em torno de 1 mm³, como recomendado em (Bozzola & Russel 1999) devem ser utilizados e, para antenas, dois cortes em duas extremidades, quando possível, devem ser feitos para facilitar a entrada do fixador. Sabe-se que o paraformaldeído penetra mais rapidamente nos tecidos do que o glutaraldeído (Haddad *et al.* 1998, Bozzola & Russel 1999) e, por esta razão o fixador de Karnovsky foi utilizado. O tempo de fixação das amostras foi prolongado para 72 horas. Os protocolos usuais de MET para amostras biológicas recomendam um tempo de 1 a 12 horas de fixação, devido ao risco de extração de material biológico que ocorre devido à ação destas substâncias. Os aldeídos reagem com determinados sítios de biomoléculas, como por exemplo os grupamentos amino (NH₂) que ocorrem nas proteínas, estabilizando as mesmas. A exposição exagerada dos tecidos ao glutaraldeído poderia gerar artefatos, embora o tempo de exposição necessário para causar tal dano ou mesmo a existência do mesmo ainda seja um assunto controverso (Bozzola & Russel 1999). Nenhuma alteração ou perda de tecido observada em amostras de antenas de formiga *Pachycondyla marginata* foi causada pelo tempo de exposição, curto ou longo, destas amostras nestas substâncias.

Outra parte crítica do processo de preparação é a desidratação e posterior infiltração da resina. Após a desidratação a amostra deve ser incluída em um material que permita a obtenção de cortes ultrafinos. Se água ou as outras substâncias químicas utilizadas durante o processo de preparação não forem totalmente removidas buracos no tecido serão

observados. A resina a ser utilizada deve ter boa estabilidade quando submetida ao feixe de elétrons, além de permitir uma contrastação adequada. Quanto menor a viscosidade, melhor a infiltração da mesma nos tecidos, especialmente os de difícil penetração, que é o caso desta formiga. Como exemplos de resina de baixa viscosidade têm o SPURR e o substituto deste, o kit Agar de baixa viscosidade.

O protocolo usual para utilização da resina SPURR recomenda a desidratação em etanol a concentrações v/v crescentes. Por outro lado, sugere-se que a acetona provoca menor retração dos tecidos, embora seja mais hidrofílica (Haddad *et al.* 1998). Nas amostras estudadas, observou-se que o uso da acetona melhorava consideravelmente a infiltração da resina nos tecidos.

Em alguns casos, recomenda-se o uso do óxido de propileno como agente de transição, que não foi utilizado devido à sua alta volatilidade e toxicidade. O uso do acetonitril (<http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/techtips/Acetonitrile.aspx>) é recomendado, já que esta solução é menos tóxica e tão efetiva quanto o óxido de propileno. Um outro protocolo, utilizado para a preparação de tecidos do nematóide *C. elegans* (Hall 1995) sugere o uso de banhos de acetona após o álcool. Um terceiro método, muito aplicado a tecidos vegetais, sugere o uso de baixo vácuo para melhorar a penetração de fixadores e resinas. Portanto, quatro distintos métodos foram testados: banhos de acetona e acetonitril com e sem vácuo com o mesmo intervalo de tempo entre as lavagens e infiltração em resina Agar de baixa viscosidade. A Figura III.5.1 mostra imagens de microscopia óptica de amostras de antenas de formiga obtidas a partir de distintas preparações. Um corte transversal do flagelo da formiga está mostrado na Figura III.5.1a. Esta antena foi imersa muito tempo depois após a morte, sem cortes nas extremidades, na solução fixadora de GA 2,5% em tampão CaCO 0,1M, infiltrada em EPON. Podemos constatar que seu interior está completamente vazio, estando presente somente a cutícula (Figura III.5.1a), mostrando que o processamento não foi adequado. A Figura III.5.1b mostra um outro corte transversal do flagelo de antena e, pode-se constatar que a amostra encontra-se bem preservada e, pode-se visualizar os nervos antenais e o epitélio. As Figura III.5.1c e Figura III.5.1d mostram um corte transversal do escapo e as estruturas encontram-se relativamente bem preservadas, embora ainda apresentem regiões sem tecido. Os nervos antenais e os músculos presentes na região do escapo são observados.

Para resolver o problema de orientação e fixação no centro do bloco das amostras cubos de agarose envolvendo as amostras foram preparados, conforme descrito em Hall (1995) após a pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4). Por último, uma boa trimagem e o uso da faca de diamante puderam garantir seções ultrafinas entre 100 e 200 nm, adequadas para observação em MET.

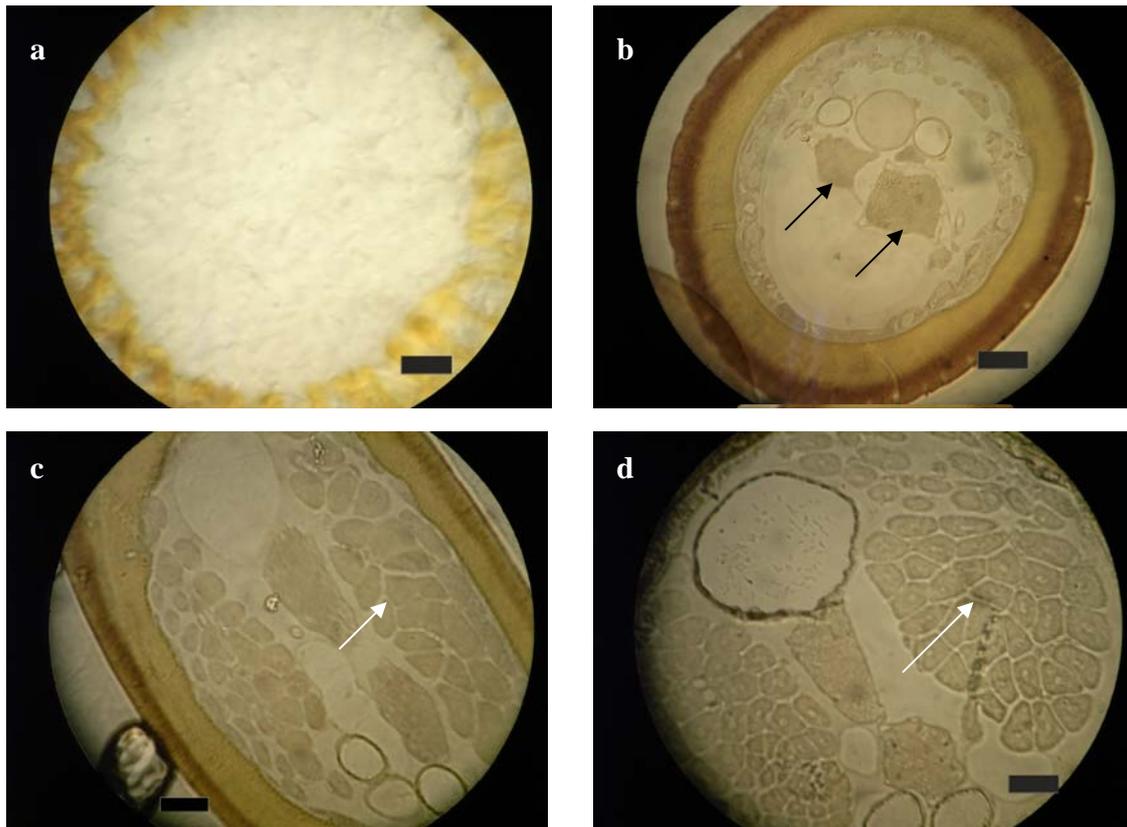
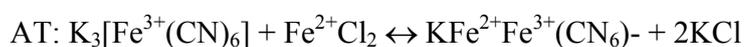
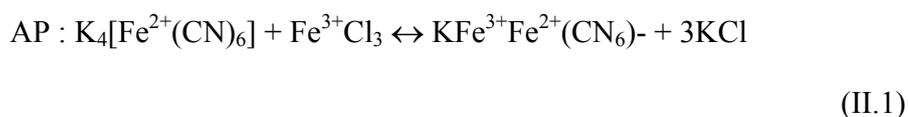


Figura III.5.1: comparação entre amostras preparadas por distintos métodos observadas no microscópio óptico. (a) e (b) correspondem a cortes transversais do 3^o segmento enquanto (c) e (d) do escapo. (a) desidratado em acetona e incluído em EPON. (b) e (c) desidratados em etanol, seguido de acetona e incluídos em kit Agar de baixa viscosidade(d) desidratados em etanol, seguido de acetonitril e incluídos em kit Agar de baixa viscosidade. Em (b) setas pretas apontam para nervos antenais, enquanto em (c) e (d) setas brancas apontam para região de músculos. Barra de escala = 20 μm .

6. Reação do azul da Prússia /Turnbull e microscopia óptica

As reações do azul da Prússia (AP) para Fe^{3+} e do azul de Turnbull (AT) para Fe^{2+} foram realizadas em seções histológicas seriadas de cabeça e antenas, inspecionadas após 10 minutos da aplicação do reagente, com o objetivo de verificar a presença de ferro. Na presença de HCl, Fe^{3+} e Fe^{2+} reagem com ferrocianeto e ferricianeto de potássio, respectivamente, dando origem ao ferrocianeto férrico e ferricianeto ferroso,



As soluções reagentes devem ser preparadas imediatamente antes do uso, pois, após o armazenamento por alguns dias surge um filete azulado dentro desta solução.

Foram analisadas seções de amostras emblocadas para MET com 5 ou 10 μm de espessura (cortes semi-finos) feitos com facas de vidro confeccionadas em um “knifemaker”. Estas amostras foram cortadas em orientação transversal ou longitudinal em relação à antena: longitudinal ao flagelo e transversal ao escapo e longitudinal ao escapo e transversal ao flagelo (Figura III.6.1).

Quando possível, a presença de Fe em cortes consecutivos da mesma amostra ou nas mesmas regiões de outra amostra foram analisados, para descartar a presença de contaminantes. Magnetita é o óxido de ferro mais frequentemente encontrado em animais e, está associado à magnetorecepção. A magnetita contém (em I.2) ions Fe^{2+} e Fe^{3+} , no entanto, como ferro férrico está presente em proteínas de estocagem de ferro, consideramos a reação ferrosa (AT) como mais apropriada para a detecção de magnetita. A reação do AP também foi utilizada. As seguintes amostras, preparadas conforme descrito em II.4, foram utilizadas:

Coleta desconhecida, preparada em Abril06: $\frac{1}{2}$ cabeça com antena (3, AT) ou antenas inteiras (1, AP) emblocadas em EPON.

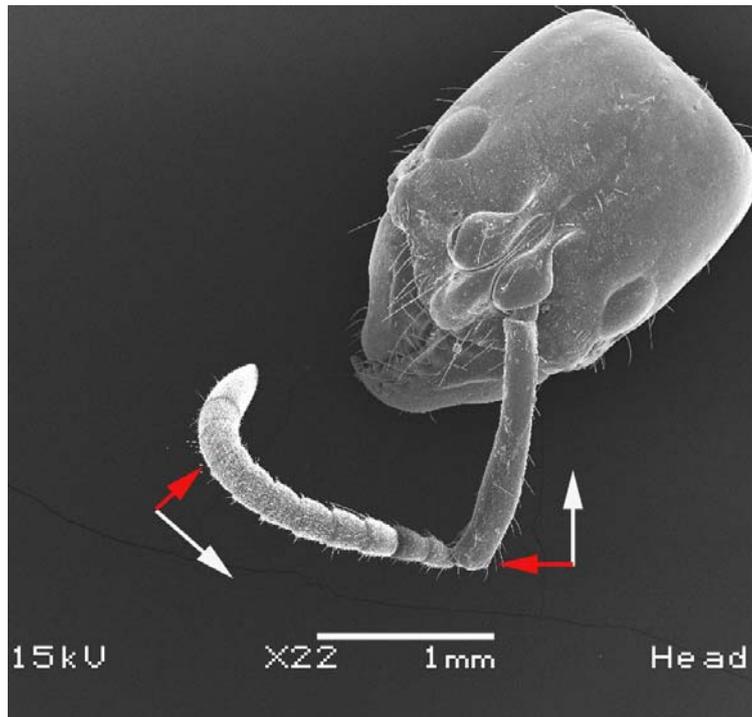


Figura III.6.1: MEV de uma cabeça com antena de formiga *Pachycondyla marginata* mostrando as direções de corte. Setas brancas indicam o sentido dos cortes transversais para escapo e flagelo e as setas vermelhas dos longitudinais. Cortes oblíquos também são obtidos dependendo do alinhamento do flagelo em relação ao escapo.

Set06: quatro amostras de $\frac{1}{2}$ cabeça + escapo e flagelo emblocadas em SPURR foram analisadas, duas pela reação do azul da Prússia e duas pelo azul de Turnbull. Foram realizados cortes transversais e longitudinais ao escapo e ambas amostras com cortes longitudinais aos segmentos do flagelo.

Fev08: o reagente foi aplicado às amostras emblocadas em kit AGAR de baixa viscosidade por 1 hora e os cortes foram lavados com ácido acético 1% para a remoção do excesso de ferrocianeto de potássio. Quatro amostras de $\frac{1}{2}$ cabeça + escapo e flagelo foram analisadas, duas pela reação do azul da Prússia e duas pelo azul de Turnbull. Foram realizados os seguintes cortes:

- infiltração em acetona:kit agar de baixa viscosidade:

escapos: transversal (1) e longitudinal (6); outros segmentos: transversal (3).

- infiltração em acetonitril+vácuo:kit agar de baixa viscosidade:

escapos: longitudinal (2); outros segmentos: transversal/oblíquo (2).

- infiltração em acetonitril:kit agar de baixa viscosidade:

escapos: transversal (1).

7. Revelação dos filmes fotográficos – Negativos

A caixa metálica fechada contendo os negativos (máximo: 48) foi retirada do MET (Jeol 100-CX) e levada para uma sala escura onde os mesmos foram revelados através da passagem de cada um dos filmes por imersão em solução reveladora (4 minutos), no banho de parada (stop bad), que consiste de água misturada com algumas gotas de ácido acético 1%, por alguns segundos para remover a primeira solução e, posteriormente, em fixador, por 10 minutos. Para a remoção de qualquer resíduo químico os negativos foram deixados em em água por 30 minutos e imersos no banho anti-estático, para evitar posterior acumulação de poeira. Os negativos permaneceram na estufa, a 40° C, por 3 horas.

8. Calibração da constante de câmera (CC) e obtenção dos espaçamentos interplanares dos padrões de difração de elétrons

A constante de câmera (CC) é definida como λL , onde L é o comprimento da câmera, usualmente expressa em mm, como mostrado na **Figura III.7.1**. Quando CC é conhecida, os espaçamentos do cristal podem ser calculados, a partir da medida de R, onde R é a distância do ponto ou anel do padrão medido a partir do centro. Da **Figura III.7.1** verifica-se que $R/L = \tan 2\theta$, para θ pequenos, $\tan 2\theta \approx \sin 2\theta \approx 2\theta$, então $R = 2L\theta$, e, da lei de Bragg para θ pequeno, $2\theta = n\lambda/d$ e então, $d = n\lambda L/R = CC/R$.

Distintos valores do comprimento de câmera são possíveis e os valores que permitirão a observação completa do padrão de difração dependem do cristal. O método de calibração usual é aquele descrito em (<http://em-outreach.ucsd.edu/web-course/toc.html>) e consiste no uso de uma substância difratante cuja estrutura é conhecida.

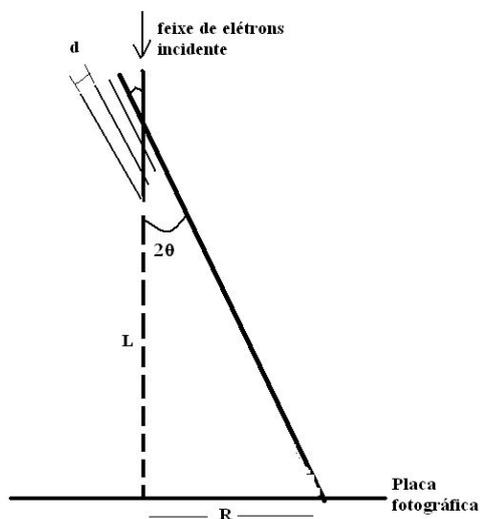


Figura III.8.1: O microscópio eletrônico como uma simples câmera de difração de elétrons.

O óxido de ferro magnetita foi utilizado como elemento de calibração, e o valor de L , obtido foi 76 mm para o microscópio Jeol 100-CX e 330 mm para o Jeol 2000-FX. Para se obter CC , os espaçamentos interplanares de magnetita policristalina e de um cristal de grafite utilizados foram consultados em uma base de dados de difração de raios-X e os diâmetros e , portanto, os raios foram obtidos a partir dos padrões de difração obtidos para os dois materiais. A média dos dois valores foi utilizada como padrão. Para o microscópio Jeol 100-CX, $CC = 27,80$ mm. (negativo) e para o Jeol 2000-FX, $CC = 74,43$ mm. Para imagens digitais (câmera CCD) CC foi sempre alterada, dependendo do monitor utilizado para o cálculo do espaçamento, utilizando o padrão de difração da magnetita policristalina e o programa ImageJ. Os espaçamentos interplanares d são conhecidos e o diâmetro do anel de máxima intensidade ($d = 2,532$ Å, $I = 100$) foi medido, e seu raio calculado de forma que uma “nova” CC foi obtida. No programa ImageJ este mesmo r foi colocado como um fator de escala para todas as outras amostras medidas sob as mesmas condições.

Capítulo IV

Resultados e discussão

1. Ressonância ferromagnética

Os espectros de RFM de materiais magnéticos, são sensíveis ao tamanho das partículas, à distância entre elas, a fase cristalina, composição e anisotropia magnética. O campo de ressonância (H_r), a largura de linha (ΔH_{pp}), o fator g_{efe} e a razão de assimetria (A_w) dos espectros de formigas inteiras e material extraído magneticamente das partes do corpo foram comparados aos do solo do ninho onde estes insetos vivem. Embora alguns dos espectros sejam claramente compostos por mais de uma linha, não foram realizados ajustes visando a separação das componentes.

1-i) medidas do solo

A amostra de solo do primeiro grupo (G1, 1g), que foi posteriormente dividida em 5 amostras G1 (0,5g, 0,250g, 0,125g e 0,100 g e 0,01 g de extrato magnético), coletada da caixa na qual as formigas estavam, foram medidas. A [Figura IV.1.1a](#) mostra espectros das amostras de solo do grupo G1 medidas à temperatura ambiente. Os espectros de RFM apresentam uma linha larga, ($\Delta H_{pp} \geq 1000$ Oe) na região de $g = 2$ (CA). Observa-se que a intensidade e ΔH_{pp} do espectro da amostra de 0,250g é maior do que as das outras amostras (curva verde na [Figura IV.1.1](#)). H_r mantém-se aproximadamente constante independente da massa, com $g_{efe} = 2,17 \pm 0,02$ ($m = 1g$), $g_{efe} = 2,15 \pm 0,01$ ($m = 0,250$ g e $0,500$ g) e $g_{efe} = 2,13 \pm 0,01$ ($m = 0,1g$ e $0,125g$). O valor de g_{efe} do extrato magnético é $2,12 \pm 0,01$. O solo da mata de Santa Genebra é constituído basicamente de argila, silte, areia fina e areia grossa ([Aguiar & Espindola 1995](#)). Na composição química deste solo encontram-se quartzo, SiO_2 , compostos de aluminosilicatos, ferro, óxidos de titânio, de ferro e de ferro-titânio.

Nas camadas mais superficiais, onde matéria orgânica também é encontrada, potássio (K), fósforo (P), manganês (Mg) e cálcio (Ca) também estão presentes a uma profundidade de até 100 cm ([Aguiar & Espindola 1995](#)). Entre estes componentes, materiais que possuem magnetização remanente, tais como magnetita e maghemita, podem dar

origem a sinais largos de RFM ($\Delta H_{pp} = 1190-1220$ Oe) à temperatura ambiente devido às fortes interações dipolo-dipolo ou acoplamento magnético. No entanto, estes sinais não podem ser relacionados a uma fase magnética específica (Fischer *et al.* 2007).

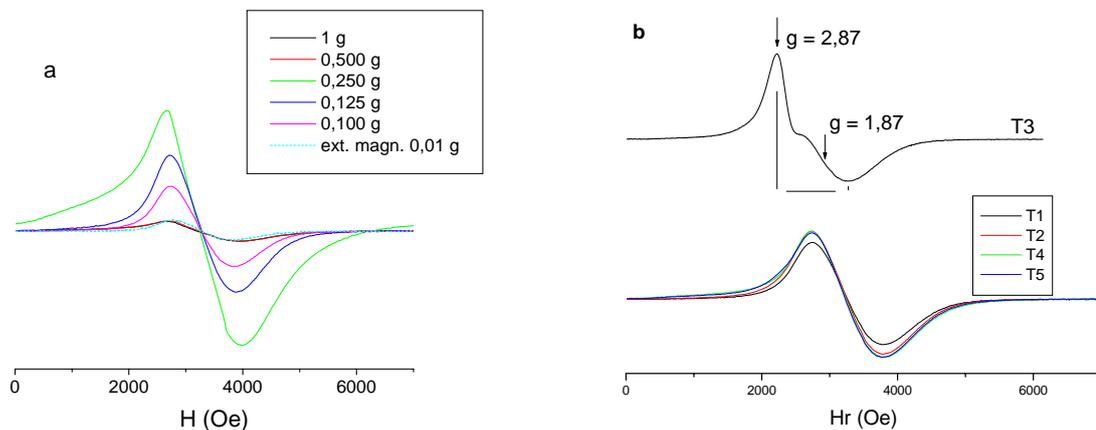


Figura IV.1.1: Espectros de RFM (a) de solo: comparação de diferentes amostras de 1g posteriormente dividida em amostras de 0,500g, 0,250g, 0,125g e 0,100g e extrato magnético 0,01 g (linha tracejada) (pmw 2mW). (b) 5 amostras de solo, $m = 0,0016$ g (pmw 4mW). Espectros foram corrigidos para mesma condição de ganho e potência. Escala vertical de (b) 2,5 vezes maior que em (a).

Como a intensidade da absorção é proporcional à susceptibilidade, em geral, o sinal de RFM de uma mistura de óxidos de ferro, contendo por exemplo goetita, hematita e magnetita é dominado pela magnetita ou maghemita. Os valores de g observados na faixa de 2,12 a 2,17 sugerem a presença de magnetita para a qual $g = 2,12$ (Bickford 1950). O mesmo resultado foi encontrado para solos tropicais formados por magnetita dispersa na matriz do solo, que consiste basicamente de quartzo (SiO_2) e montmorillonita (composição: silicato de alumínio, magnésio e cálcio hidratado; fórmula: $(\text{Na,Ca})_{0,3}(\text{Al,Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2.n\text{H}_2\text{O}$) (Fischer *et al.* 2007). A variação do valor de g indica a presença de misturas de materiais magnéticos, na composição ou no tamanho das partículas (Fischer *et al.* 2007).

Os espectros das amostras do grupo 2 (0,0016 g) são mostrados na Figura IV.1.1b. Quatro espectros apresentam linha larga, similar àquelas da Figura IV.1.1a com valores de

g entre $2,13 \pm 0,01$ e $2,16 \pm 0,01$ e ΔH_{pp} na faixa de 1050 a 1200 Oe. Somente uma amostra possui forma de linha caracterizada pela presença de duas contribuições, indicadas na **Figura IV.1.1b**, com $g_{CA1\text{efe}} = 1,86$ e $g_{CA2\text{efe}} = 2,87$ e ΔH_{pp} aparente de 1300 Oe.

Weiss *et al.* (2004) propuseram um diagrama no qual se plota a A_w em relação a g somente para valores a temperatura ambiente. Os valores de A_w e g_{efe} obtidos estão mostrados na **Figura IV.1.2**. O extrato magnético de solo (grupo1, ext 0,01g) possui A_w e g_{efe} mais próximos dos valores de diversos tipos de magnetita, de acordo com as amostras analisadas por Weiss *et al.* (2004) (**Figura IV.1.2**). Entre estas amostras encontram-se partículas de magnetita biologicamente induzidas, ou seja, de origem extracelular produzidas por seis microorganismos (Weiss *et al.* 2004). Estas partículas são pouco cristalinas, possuem impurezas e se apresentam na forma de grãos extremamente finos, normalmente superparamagnéticos com tamanhos menores do que 30 nm. Dos resultados a temperatura ambiente pode-se afirmar que a distribuição das partículas magnéticas no solo da mata de Santa Genebra é heterogênea.

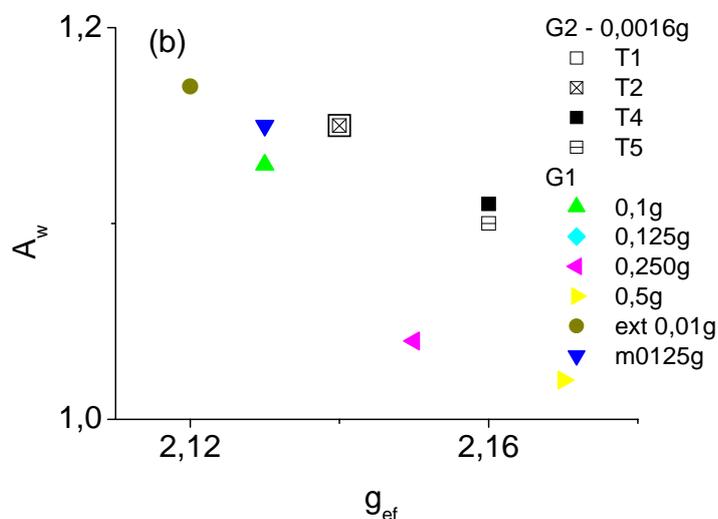


Figura IV.1.2: Diagrama dos parâmetros obtidos dos espectros de RFM, segundo Weiss *et al.* (2004) das amostras de terra medidas a temperatura ambiente.

O desvio dos valores de g e variações em ΔH_{pp} para as outras amostras de solo podem estar relacionadas à dispersão destes grãos de magnetita, encontrados nos extratos,

em uma matriz rica em outros minerais magnéticos. Espectros das amostras terra 3 (T3) e terra (T4) de 5K a 300K, são mostrados na **Figura IV.1.3**.

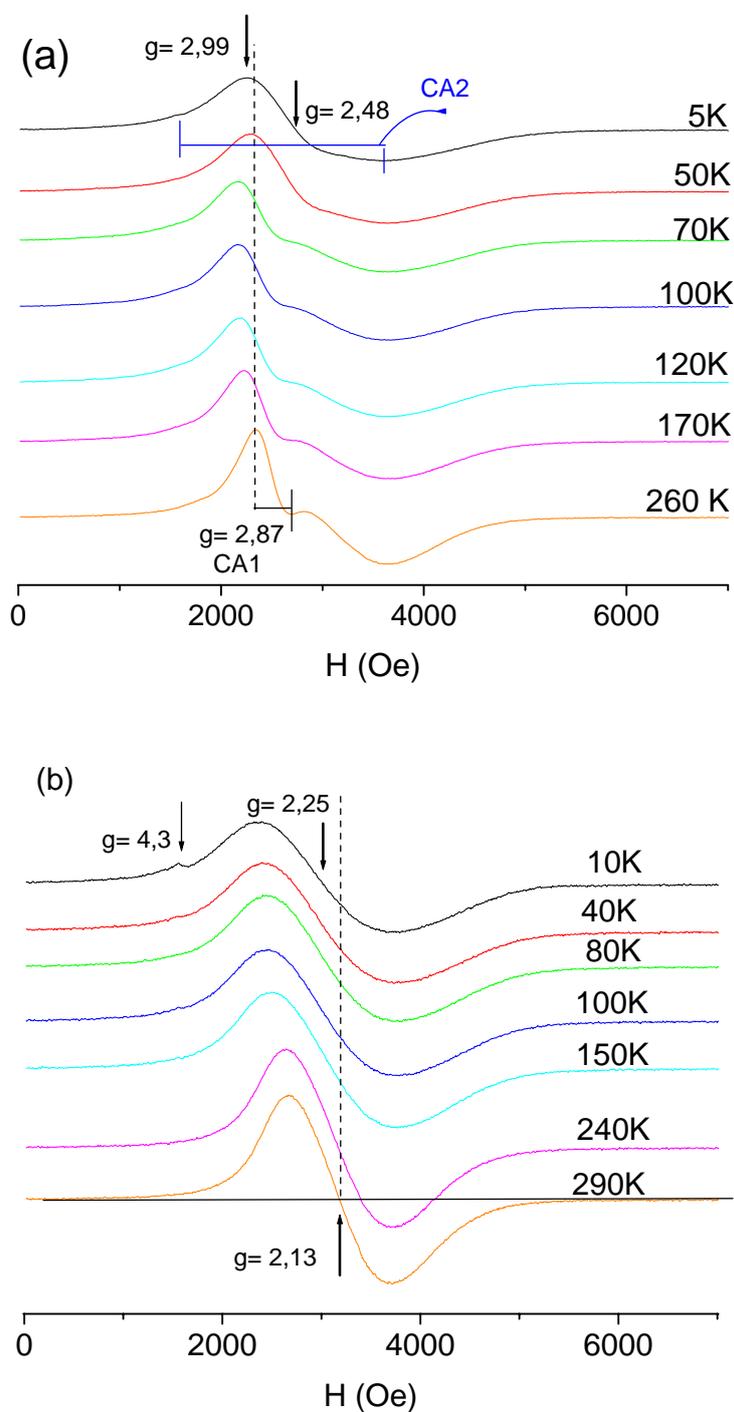


Figura IV.1.3: variação térmica dos espectros (a) T3 e (b) T4.

Os espectros de T3 são compostos de duas linhas, uma larga ($\Delta H_{pp} \sim 1200\text{G}$) em torno da região de $g = 2,48$ e outra cujo máximo se desloca de 2250 Oe ($g = 2,99$) a baixas temperaturas para $H \sim 2360\text{ Oe}$ ($g = 2,87$), com um mínimo em 2160 Oe na faixa de 70 a 100K (Figura IV.1.3a).

Os espectros de T4 podem ser descritos como uma linha larga (1400 Oe) na região de $g = 2,25$ a baixa temperatura que se desloca para campo alto ($g = 2,13$) diminuindo a largura até 1000 Oe a 280K . Em campo baixo um sinal em $g = 4,3$, relacionado à presença do íon Fe^{3+} em sítios de coordenação octaédricos distorcidos, cuja intensidade diminui com a temperatura, é observado nos espectros na faixa de temperatura de 5 a 40K (na Figura IV.1.3b).

A variação térmica dos parâmetros espectrais de T3 e T4 são comparados na figura Figura IV.1.4. O comportamento qualitativo das duas componentes de H_r da amostra T3, são mostrados na Figura IV.1.4a, juntamente com o H_r da amostra T4. H_r para uma das componentes de T3 e de T4 mantém-se constantes entre 5 e 60K , decrescendo para valores menores entre 70K e 140K e aumentando linearmente com a temperatura a partir de 150K (Figura IV.1.4a). Já o H_r de campo alto da amostra T3 mantém-se constante em toda a faixa de temperatura.

Nenhuma súbita alteração de valores de qualquer um dos parâmetros, que pudesse ser sugestivo da transição de Verwey para magnetita foi observado. A variação térmica dos parâmetros de T3 e T4 confirmam a presença de partículas superparamagnéticas com $A \sim 1$. Especialmente para a amostra T4 uma transição a 230K é observada para os valores de A_w , indicando uma mudança de linha de simétrica para assimétrica. No entanto, nenhuma alteração nesta temperatura para os outros parâmetros de RFM foram observados. A ausência de variação do parâmetro S com a temperatura pode ser um indicativo de uma forte contribuição da constante de anisotropia de superfície, como foi observada em amostras de magnetita de $2,5\text{ nm}$ (Vargas *et al.* 2008).

Um sistema de partículas de magnetita superparamagnéticas apresentam ΔH_{pp} e g_{efe} que aumentam com o decréscimo da temperatura (Abe *et al.* 1976, Muxworthy & McClelland 2000). Já sistemas de partículas MD possuem ΔH_{pp} grande ($> 2000\text{ Oe}$ para magnetita e 1600 Oe para maghemita), g_{efe} bem acima do valor de elétron livre ($g_{\text{efe}} \gg 2$) e

$A > 1$ (informação suplementar, Weiss *et al.* 2004). Os dados de variação térmica estão em concordância com os resultados já discutidos a temperatura ambiente.

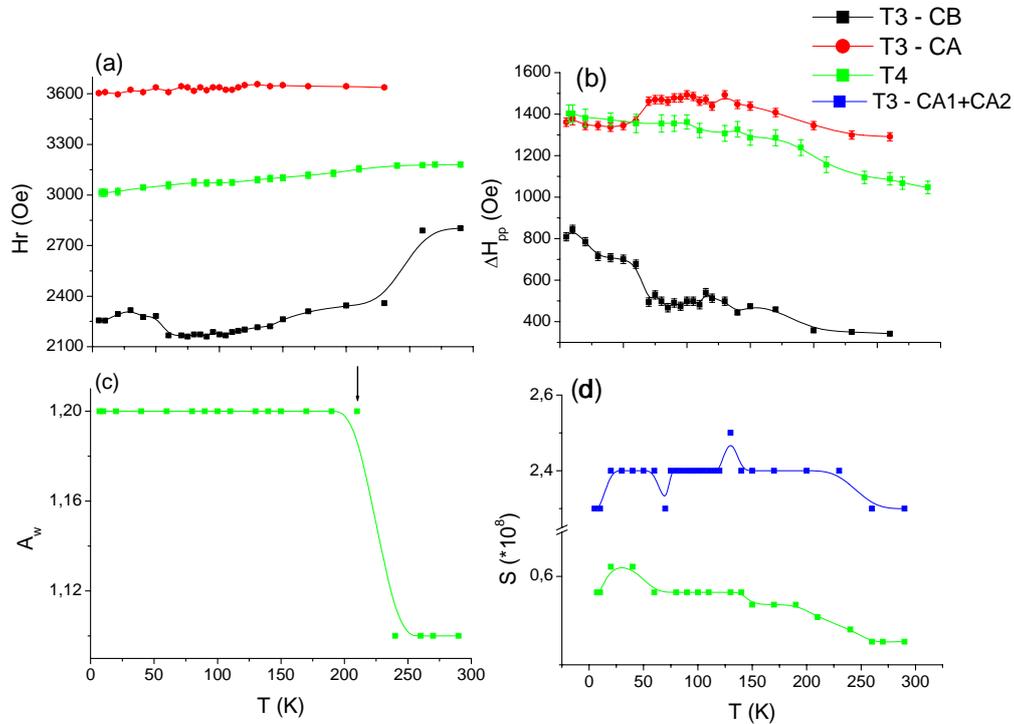


Figura IV.1.4: Variação térmica dos parâmetros dos espectros de RFM. (a) campo de ressonância, H_r (b) largura de linha, ΔH_{pp} (c) fator de assimetria, A_w , seta aponta para temperatura de transição ($T = 210$ K) (d) 2^a integral ou área do espectro de absorção, S .

A variação térmica de H_r da amostra T4 é linear em toda a faixa de temperaturas medida, de 7 a 300K, enquanto da componente CA1 da amostra T3 é linear a partir de 70K (Figura IV.1.4a), com $A = 3005 \pm 4$, $B = 0,63 \pm 0,02$ e $A = 2078 \pm 7$, $B = 0,95 \pm 0,05$, respectivamente na eq. I.3.8 (Morais *et al.* 2005), com estimativas de K_{efe} de $(8,4 \pm 0,2) \times 10^4$ erg/cm³ e de $(6,6 \pm 0,2) \times 10^4$ erg/cm³, respectivamente. Estes valores (Morais *et al.* 2000) são uma ordem de grandeza maiores do que o da magnetita maciça ($K_{Imacica} = 1,1-1,3 \times 10^5$ erg/cm³). O maior valor de K_{efe} de T4 em relação à componente CA1 de T3 sugere a presença de partículas menores na primeira amostra, devido ao aumento da contribuição de

superfície (Bodker *et al.* 1994) ou à contribuição da superfície de partículas pseudomonodomínio (PSD) ou multidomínio (MD) (Griscom 1974, Fischer *et al.* 2007).

Para obtermos os diâmetros magnéticos médios das partículas, utilizamos a eq. I.3.9. A Figura IV.1.5 mostra a variação de ΔH_{pp} com o inverso da temperatura para a componente CA1 da amostra T3 e da amostra T4.

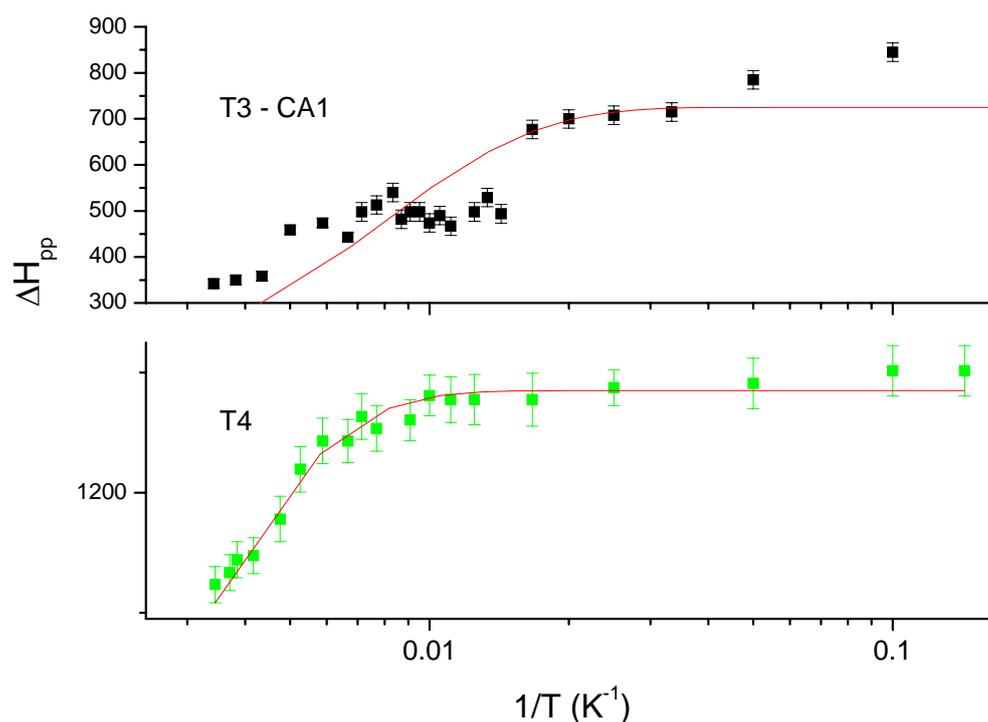


Figura IV.1.5: Variação da largura de linha com o inverso da temperatura para a componente CA1 da amostra T3 e da amostra T4. Linha cheia ajuste da eq. I.3.9, com $KV = (2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}$ erg e pré-fator = 725 ± 33 Oe e $KV = (7,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}$ erg e pré-fator = 1370 ± 7 Oe, para CA1 de T3 e T4 respectivamente.

Os dados de T3 se ajustam razoavelmente, enquanto os de T4 se ajustam bem em toda faixa de temperatura, com parâmetros $KV = (2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}$ erg e pré-fator = 725 ± 33 Oe e $KV = (7,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}$ erg e pré-fator = 1370 ± 7 Oe, respectivamente. Utilizando os valores de K_{efe} obtidos, diâmetros médios de $9,0 \pm 0,2$ e $15,1 \pm 0,1$ nm, foram obtidos para a componente CA1 de terra 3 e terra 4, respectivamente.

1-ii) Diferenças individuais

A Figura IV.1.6 mostra alguns espectros de RFM de formigas “mortas”. A forma de linha dos espectros a temperatura ambiente (TA) de 47 formigas “mortas” e 4 formigas “vivas” orientadas perpendicularmente ao campo são similares, apresentando somente uma variação de intensidade. Os espectros são compostos de uma linha larga, ($\Delta H_{pp} \sim 1000$ Oe na região de $g = 2$ (campo alto, CA) usualmente associadas à presença de nanopartículas isoladas (Wajnberg *et al.* 2000).

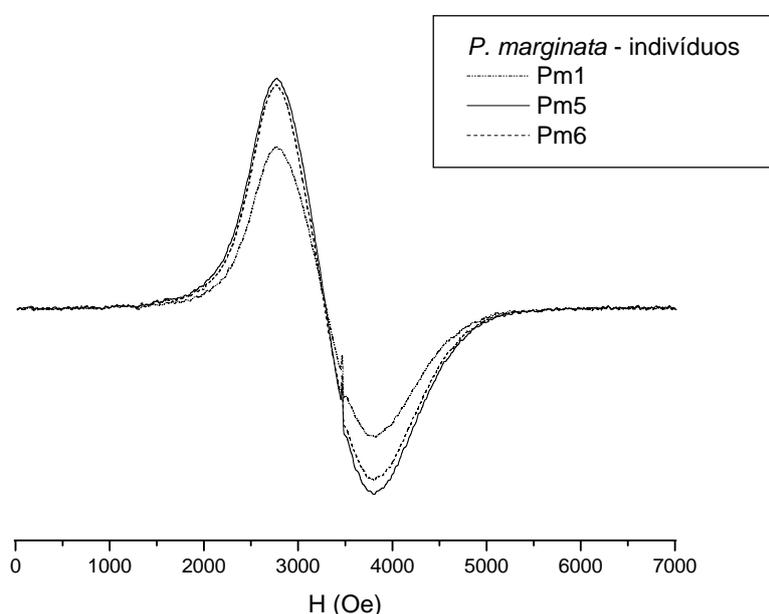


Figura IV.1.6: Espectros a temperatura ambiente de 3 formigas *P. marginata* “mortas”.

As distribuições dos parâmetros espectrais obtidas para as pmw de (4mW e 10 mW) são mostradas na Figura IV.1.7. A regra de Sturge, $k = 1 + 3,322 \cdot \log N$, foi utilizada para se estimar o número k de classes dos histogramas, onde N é o número de medidas. O campo de ressonância médio é de 3283 ± 16 Oe (média \pm desvio padrão). As larguras médias são 1027 ± 43 Oe (4 mW) e 1038 ± 24 Oe (10 mW). As médias das áreas são $(5,4 \pm 2) \cdot 10^7$ u.a. (4 mW) e $(7,9 \pm 2) \cdot 10^8$ u.a. (10 mW).

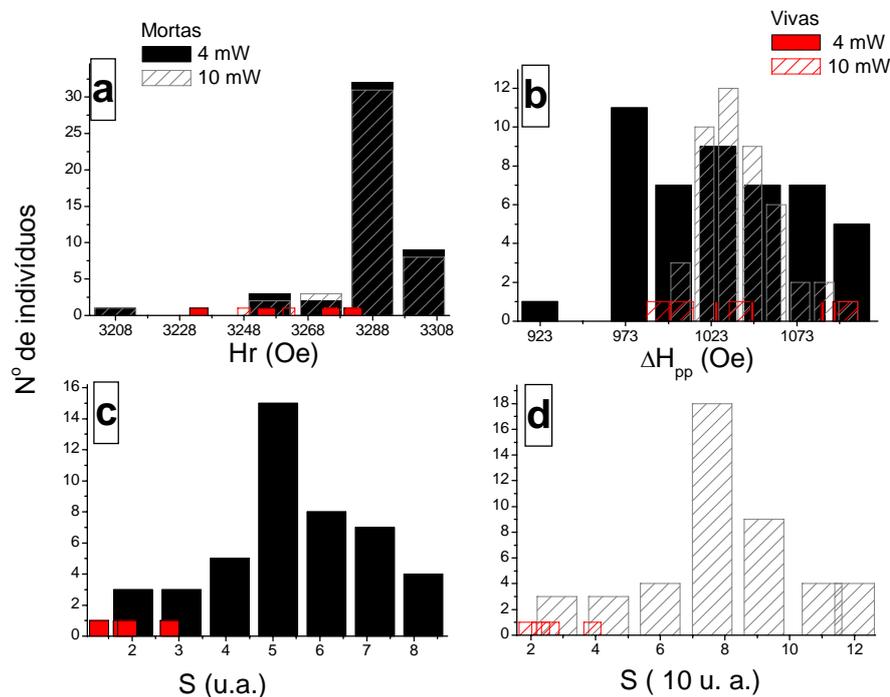


Figura IV.1.7: Distribuição dos parâmetros de RFM: (a) Hr, (b) ΔH_{pp} , (c) S para 4 mW e (d) 10 mW.

Os parâmetros espectrais apresentam uma distribuição estreita e não dependem do número de dias entre a coleta e o dia de morte da formiga. As medidas de algumas formigas “mortas”, foram repetidas um dia após a primeira medida, com variações temporais de intensidade, de aproximadamente 2%. Uma variação angular grosseira (0° , 90° , 180° e 270°) foi feita em somente uma amostra e a maior variação de intensidade encontrada foi de 1,3%.

Os valores de Hr e ΔH_{pp} das amostras “vivas” estão dentro do intervalo de referencia ($\pm 2x$ desvio padrão) da distribuição de “mortas”. A quantidade de material magnético, proporcional ao parâmetro S (10 mW), é maior nas amostras “mortas” do que nas amostra “vivas” e, isso provavelmente ocorre devido à agregação de solo à cutícula das formigas, observada em indivíduos mortos encontrados no ninho.

1-iii) Remoção de contaminantes da cutícula das formigas

As 47 formigas “mortas” e 10 formigas “vivas” (as 4 utilizadas anteriormente e mais outras 6 retiradas da caixa no dia da medida) foram divididas em 4 grupos. Cada grupo foi submetido a diferentes tratamentos para retirada de material da cutícula: imersos em etanol 70% (et), etanol 70% + ultrassom (et-US), água (H₂O) e água + US (H₂O-US). As médias dos parâmetros espectrais de cada grupo de formigas “mortas” medidas individualmente são mostradas na **Tabela IV.1.1**. Os valores de cada grupo de formigas “vivas” são mostrados individualmente, o número entre parênteses indica a repetição do valor encontrado.

	Mortas			Vivas		
Médias: 4 mW	Hr (Oe)	DHpp (Oe)	S (u.a.)	Hr (Oe)	DHpp (Oe)	S (u.a.)
Et 70%	3275±48	998±37	(4±2)*10 ⁷	3289; 3303(2x)	1095;1013; 1102	1,1*10 ⁷ (2x); 1,4*10 ⁷
Et +US	3290±14	1102±53	(3±1)*10 ⁷	3303(2x); 3330	925;990; 1095	1,5*10 ⁶ ;5*10 ⁶ ; 7,2*10 ⁶
H ₂ O	3293±11	1035±69	(3±1)*10 ⁷	3268;3303	860;1218	6,5*10 ⁶ ;1,6*10 ⁷
H ₂ O+US	3275±14	1056±74	(2,3±0,6)*10 ⁷	3070;3296	1143;1245	4,7*10 ⁶ ,
De i)	3283±16	1027±43	(5±2)*10 ⁷	3267±15	1035±49	(2±0,6)*10 ⁷
Médias: 10 mW	Hr (Oe)	DHpp (Oe)	S	Hr (Oe)	DHpp (Oe)	S
Et 70%	3285±9	1033±33	(6±3)*10 ⁸	3303	992;999; 1026	1,6*10 ⁸ ;2,2*10 ⁸ 2,3*10 ⁸
Et +US	3296±12	1042±42	(4±2)*10 ⁸	3289;3309; 3316	917;960; 966	1,2*10 ⁷ ;7,2*10 ⁷ 1,5*10 ⁸
H ₂ O	3297±9	1043±40	(4±1)*10 ⁸	3255;3268	920;1033	8,3*10 ⁷ ;2,3*10 ⁸
H ₂ O+US	3270±16	1076±52	(3,3±0,9)*10 ⁸	3084;3289	1033;1220	1,4*10 ⁷ ;7,4*10 ⁷
De i)	3284 ±16	1038± 24	(7,9±2)*10 ⁸	3262±22	1064±33	(2,7±0,9)*10 ⁸

Tabela IV.1.1: valores e média dos parâmetros Hr, ΔH_{pp} e S para 4 e 10 mW de formigas vivas e mortas, respectivamente, imersas em quatro substâncias distintas.

Com os dados da tabela é possível verificar que os valores de H_r e ΔH_{pp} das amostras mortas e imersas em substâncias, ou mesmo amostras vivas estão dentro do intervalo de referência ($\pm 2x$ desvio padrao) da distribuição de “mortas” originais.

A eficiência da limpeza de contaminantes da superfície do corpo dos insetos foi avaliada através dos valores de S . Uma comparação entre os valores de S de amostras “mortas”, dentro do intervalo de referência, antes e depois da lavagem mostra que não há diferença relevante na quantidade de material magnético presente. Observações em laboratório mostraram que formigas mortas que permanecem em contato com o solo passam a agregar grande quantidade de terra que é visível a olho nu. O processo de lavagem, portanto, não é eficiente para amostras nestas condições. A redução na quantidade de material magnético das amostras “vivas” pela lavagem, é de até 2 vezes em H_2O-US e de 1 a 5 vezes para amostras lavadas em H_2O ou $et-US$. As formigas vivas agregam menos contaminantes, que são mais facilmente removidos do que nas formigas mortas. A presença de maior volume de material precipitado na lavagem de formigas “mortas” foi observada a olho nu nas soluções utilizadas.

1-iv) Medidas das partes do corpo

As formigas imersas nas distintas soluções foram divididas em antenas, cabeças, tórax, pernas e abdomens. Durante o processo de divisão algumas partes foram perdidas. Na [Tabela IV.I.2](#) estão mostradas as médias e o erro padrão, sempre normalizadas para um indivíduo, das áreas obtidas a partir das medidas de uma unidade de cada parte até o valor máximo possível, que depende do volume desta parte e da região homogênea de campo magnético para o RFM. Para as amostras vivas, onde poucas quantidades foram utilizadas, misturou-se as amostras que foram lavadas com e sem sonicação em água.

S média da soma da área das partes foi comparada com a S média de formigas inteiras, e obtivemos o mesmo resultado para amostras mortas indicando que não houve perda de material magnético durante os procedimentos de corte. Já que as quantidades individuais podem variar muito, o mesmo resultado não foi obtido para amostras vivas, onde somente 4 amostras foram utilizadas.

(a) área S (*10⁶)

	Et+Us (M) [max]	Et+US (V) [max]	Água+US (M) [max]	Et 70% (M) [max]	Et 70% (V) [max]	Água (M) [max]	Água ou Água+US (V) [max]
Cabeças	18±2 [11]	1,5±0,4 [2]	17±4 [16]	20±10 [6]	6±3 [2]	14±2 [4]	3±1 [4]
Par de Antenas	0,3±0,2 [4]	2±0,2 [4]	0,38±0,08 [34]	1,8±0,3 [8]	0,45* [4]	2,2±0,6 [6]	-
Abdômens	3,1±0,9 [11]	9±4 [2]	4±2 [16]	4±2 [6]	7,4* [1]	6±1 [4]	5,9±0,2 [2]
3 pares de Pernas	1,8±0,4 [60]	1,4* [6]	5±3 [24]	6±4 [18]	5,6* [6]	-	2,2* [6]
Tórax	4±3 [11]	2,8* [3]	3±2 [16]	7±2 [6]	2,9±0,8 [3]	4±1 [4]	1,3±0,2 [4]
Soma das partes	27±7	17±5	27±11	39±18	23±4	26±5	12,4±1,4
individuo	30±10	5±3	23±6	40±20	13±2	30±10	5*

(b) fração de material magnético(%)

	Et+Us (M)	Et+US (V)	Água+US (M)	Et 70% (M)	Et 70% (V)
Cabeças	66±7	9±2	58±14	52±26	27±13
2 Antenas	1±1	12±1	1,3±0,3	5±1	2*
Abdômens	11±3	54±24	14±7	10±5	33*
6 Pernas	7±1	8*	17±10	15±10	25*
Tórax	15±11	17*	10±7	18±5	13±4

Tabela IV.1.2: (a) área S obtida pelo programa winepr e, (b) frações de material magnético (M) corresponde ao grupo de amostras mortas, enquanto (V) ao grupo de amostras vivas. [max] refere-se ao número máximo de partes medidas de uma só vez. (*) amostras para quais somente um valor pode ser obtido, portanto não há desvio padrão calculado.

Observa-se que enquanto as cabeças das formigas mortas possuem a maior fração de material magnético, para as formigas “vivas” os abdomens apresentam a maior quantidade. Esta diferença deve estar relacionada à estatística, já que a quantidade de indivíduos “vivos” utilizada para esta medida é pequena. Por outro lado, é possível que as amostras de formigas “mortas” acumulem mais partículas do solo na cabeça.

O resultado de formigas “vivas” está de acordo com a relação de 3:1:2 no abdômen, tórax e cabeça, encontrada, através de medidas de MET, para o número relativo de partículas magneticamente extraídas de formigas *P. marginata* “mortas” (Acosta-Avalos *et al.* 1999). Por outro lado, medidas de curvas de histerese mostraram que a maior contribuição é das antenas destas formigas (Wajnberg *et al.* 2004), em contraste com o presente resultado. A magnetização de saturação (J_s), que é proporcional à quantidade de material magnético presente na amostra, foi utilizada na estimativa desta quantidade. Embora os parâmetros S e J_s sejam determinados por técnicas diferentes, podem ser correlacionados (Oliveira *et al.* 2005). Como S é proporcional a suscetibilidade magnética, um parâmetro anisotrópico, a diferença entre os resultados pode estar associada a diferença na orientação da amostra, variações individuais devido às diferenças de casta e/ou idade (Abraçado *et al.* 2009). A outra possibilidade pode estar vinculada à contaminação, tanto através da não-lavagem, como métodos de conservação (Chambarelli *et al.* 2008) como observado em outras espécies de insetos sociais (Abraçado *et al.* 2009). No entanto o resultado de formigas “mortas” estão de acordo com o observado em formigas *Solenopsis* mortas (Abraçado *et al.* 2005, Abraçado *et al.* 2008) e abelhas *Swarziana quadripunctata* mortas (Lucano *et al.* 2006) se considerarmos a soma do material na cabeça e antena.

Ao final, (47) formigas “mortas” e (12) “vivas” foram misturadas. Os espectros da amostra com a quantidade máxima de cada parte do corpo foram normalizados para uma unidade (Figura IV.1.8).

Os valores médios de H_r , g e ΔH_{pp} das amostras foram obtidos a partir de medidas, desde 1 unidade até um máximo de partes possível. Quando mais de uma unidade foi medida, estes valores foram normalizados para uma unidade e a média foi obtida. Estes resultados estão mostrados na Tabela IV.1.3. H_r (g_{efe}) e ΔH_{pp} são os mesmos, dentro do erro padrão, que os encontrados para os extratos de terra e para as amostras de solo.

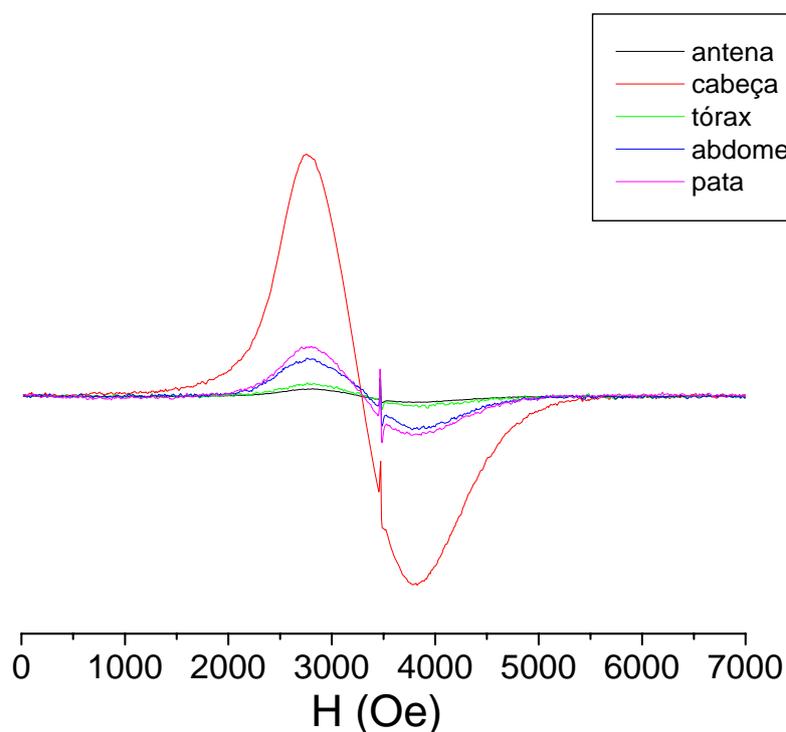


Figura IV.1.8: Espectros a temperatura ambiente de formigas *P. marginata* “mortas”

Os espectros de solo, exceto a amostra T3, não podem ser distinguidos das partes do corpo da formiga, a temperatura ambiente (veja Figuras III.1.1b, III.1.6 e III.1.8). Os valores de g_{efe} de todas as partes estão próximos a $g=2,12$, associado a magnetita (Bickford 1950).

MORTAS	Quantidade max. medida	Hr (Oe) \pm dp	$g \pm$ dp	ΔH_{pp} (Oe) \pm dp
Cabeças	16	3287 \pm 4	2,120 \pm 0,003	1028 \pm 46
Antenas*	78	3297 \pm 47	2,11 \pm 0,03	1022 \pm 36
Escapos**	88	3300	2,11	958
Flagelos**	92	3306	2,11	999
Tórax	16	3295 \pm 25	2,11 \pm 0,02	1029 \pm 39
Abdômen	12	3334 \pm 22	2,09 \pm 0,01	1073 \pm 61
Pernas	60	3299 \pm 9	2,14 \pm 0,04	1028 \pm 16

VIVAS	Quantidade max. medida	Hr (Oe) \pm dp	g \pm dp	ΔH_{pp} (Oe) \pm dp
Cabeças	12	3293 \pm 16	2,12 \pm 0,01	1002 \pm 28
Antenas*	20	3293 \pm 34	2,12 \pm 0,02	1006 \pm 38
Escapos*	-	-	-	-
Flagelos*	-	-	-	-
Tórax	10	3307 \pm 16	2,11 \pm 0,01	976 \pm 91
Abdômen	8	3318 \pm 30	2,10 \pm 0,02	1129 \pm 53
Pernas	24	3308 \pm 6	2,108 \pm 0,005	1016 \pm 12

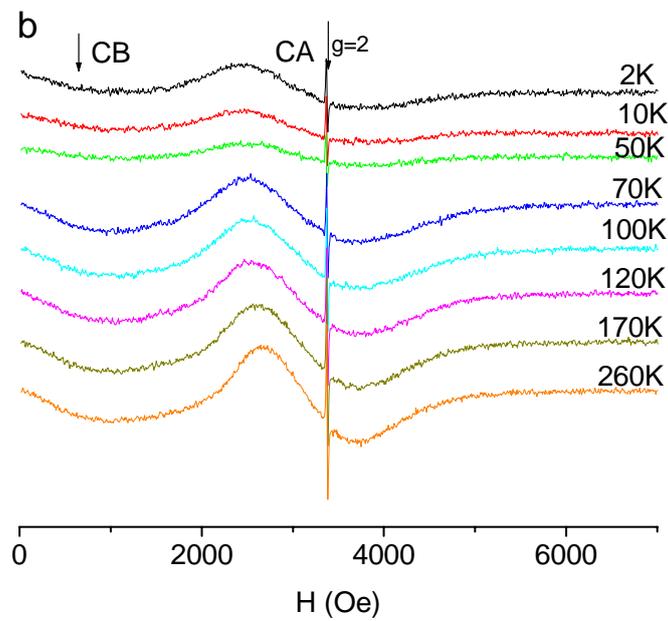
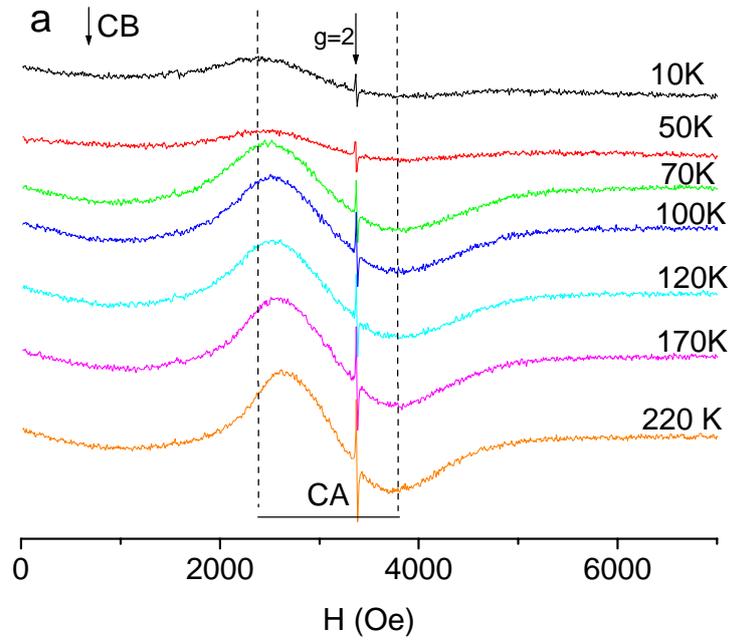
TERRA (T)	Quantidade	Hr \pm erro (Oe)	g \pm erro	ΔH_{pp} \pm erro (Oe)
T3 - CB*	0,0016g	2358 \pm 7	2,870 \pm 0,004	342 \pm 20
T3 - CA*	0,0016g	3638 \pm 7	1,860 \pm 0,004	1291 \pm 20
Médias T1-T4*	0,0016g	3244 \pm 14 (dp)	2,15 \pm 0,01 (dp)	1071 \pm 10 (dp)
T*	0,1g	3268 \pm 19	2,13 \pm 0,01	1136 \pm 38
T*	0,125g	3268 \pm 19	2,13 \pm 0,01	1191 \pm 38
T*	0,250g	3241 \pm 22	2,15 \pm 0,01	1327 \pm 44
T*	0,5g	3243 \pm 20	2,15 \pm 0,01	1252 \pm 40
T*	1g	3208 \pm 25	2,17 \pm 0,02	1037 \pm 50
Extrato T*	0,01g	3282 \pm 7	2,120 \pm 0,005	1081 \pm 7

Tabela IV.1.3: valores médios de Hr, g e ΔH_{pp} para as partes do corpo de formiga *P. marginata* e amostras de solo. (*) valores individuais (**) somente uma amostra contendo 88 escapos e 92 flagelos de mistura de formigas “mortas” e “vivas”.

S dos espectros de cabeças, tórax e abdômens crescem linearmente com a quantidade de partes individuais, embora não tenha sido possível fazer esta observação: no caso das pernas onde não houveram medidas relacionadas ao aumento da quantidade de pernas e, no caso da antena onde a presença da componente de campo baixo não permite a obtenção do valor correto de S a partir do programa winepr.

I-v) variação térmica

Espectros de RFM das partes de formigas e seus extratos foram obtidos de 5K a 300 K, congelando sem campo (ZFC). A variação térmica de 88 escapos e 92 flagelos, está mostrada na Fig. III.1.9a e b.



Os espectros são compostos de uma linha larga na região de campo alto (CA), em torno de $g \sim 2$ e outra na região de campo baixo (CB) que tem sido usualmente associadas à presença de nanopartículas isoladas e aglomeradas, respectivamente. A linha estreita em $g = 2$ está associada a radicais livres. Um alteração abrupta na intensidade da linha é facilmente observada a 70K. A variação térmica dos espectros dos extratos magnéticos destas antenas são mostrados na **Fig. III.1.9c**. A componente de CB não é observada, mas entre 5 e 230K o sinal em $g = 4,3$ associado ao íon de Fe(III) está presente.

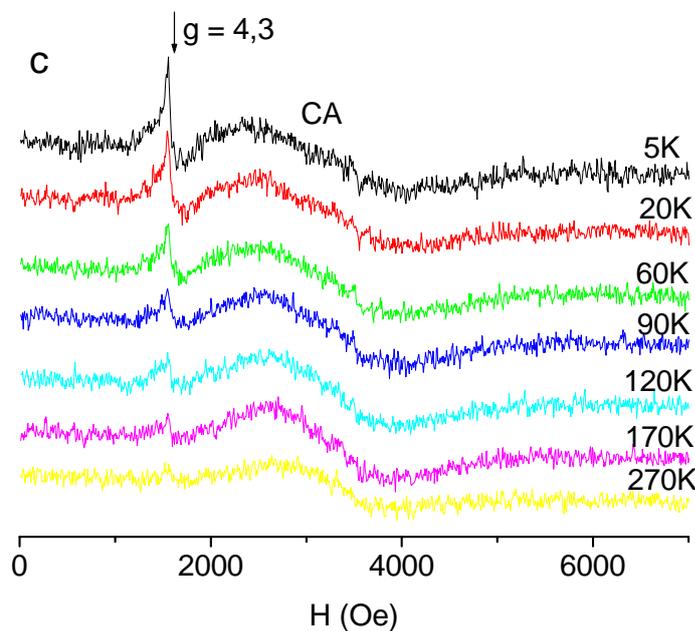


Figura IV.1.9: variação térmica dos espectros de (a) 88 escapos, (b) 92 flagelos. pmw: 20mW, ganho: $1 \cdot 10^5$ e 4 varreduras. (c) extratos magnéticos de antena. pmw: 20mW, ganho: $6,3 \cdot 10^4$ e 1 varredura.

A variação térmica de H_r da linha CA dos espectros de escapos, flagelos e extratos de antena estão mostrados na **Figura IV.1.10**. Os comportamentos das curvas do flagelo e escapo são similares, exceto entre 5 e 40 K, onde os valores de H_r são maiores para o escapo. H_r do escapo possui um pico em $T = 40K$ e aumenta linearmente com a temperatura acima de 150K, enquanto para o flagelo, a partir de 60K (**Figura IV.1.10a**). Os valores de H_r dos extratos de antena aumentam com a temperatura entre 5 e 30K e entre 210K e 300K,

mantendo-se constante no intervalo entre estas duas faixas de temperatura (Figura IV.1.10a). Do ajuste linear para estas três amostras obtém-se $A = 3015 \pm 22$ e $B = 0,8 \pm 0,1$ ($T > 150K$), $A = 3028 \pm 5$ e $B = 0,69 \pm 0,03$ ($T > 60K$) e $A = 3046 \pm 51$ e $B = 1,3 \pm 0,2$ ($T > 210K$), respectivamente na eq. I.3.8 (Morais *et al.* 2005).

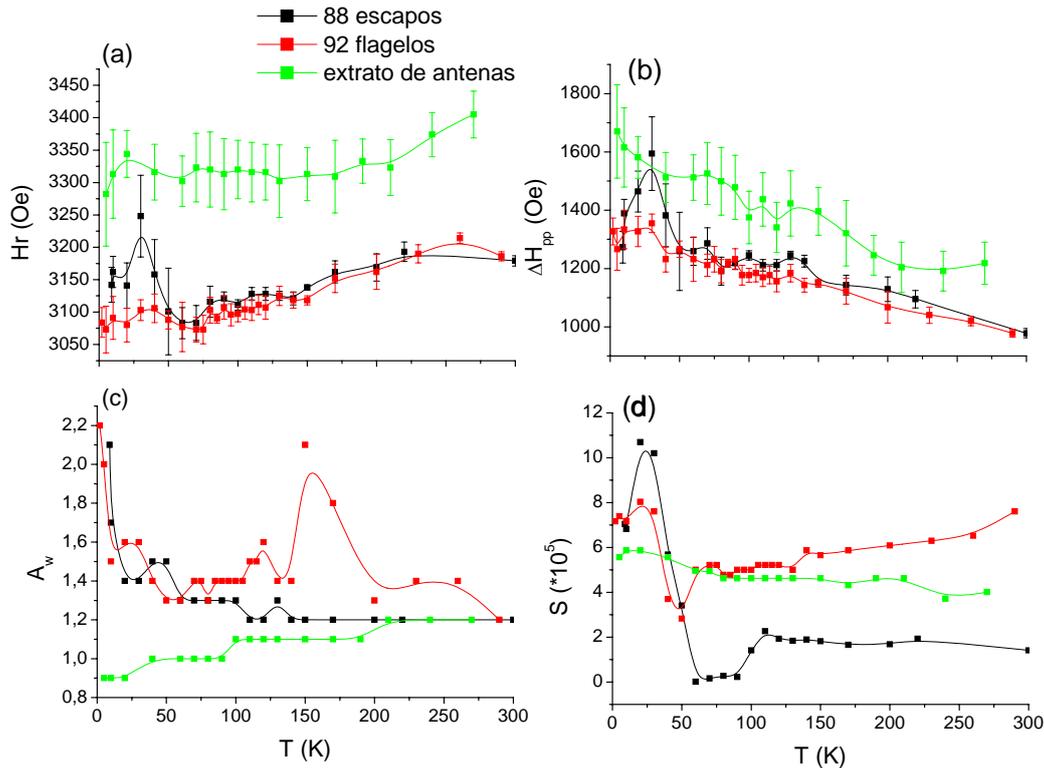


Figura IV.1.10: Variações térmicas dos parâmetros dos espectros de RFM de escapos, flagelos e extratos de antena. (a) campo de ressonância – H_r , (b) largura de linha – ΔH_{pp} (c) fator de assimetria – A_w (d) 2^a integral ou área do espectro de absorção.

Os valores de K_{efe} obtidos para as duas partes da antena, escapo e flagelo, não diferem, sendo de $(1,0 \pm 1) \times 10^5$ erg/cm³ e $(9,3 \pm 0,3) \times 10^4$ erg/cm³, respectivamente. Já para os extratos de antenas, $K_{efe} = (1,8 \pm 0,3) \times 10^5$ erg/cm³. Este valores são maiores do que aquele obtidos para as amostras de terra e o valor de K_{efe} dos extratos é maior do que a de magnetita maciça ($K_{1maciça} = 1,1-1,3 \times 10^5$ erg/cm³). Esta diferença pode ser causada pelo

processo químico de extração. Towe (1985) sugeriu que o NaOCl era capaz de degradar magnetita e produzir maghemita, hematita ou outros óxidos de ferro, dependendo do tempo de reação. Portanto, o NaOCl também pode ter causado o aumento do valor de K_{efe} nos extratos devido à provável alteração de óxidos de ferro. Extração magnética utilizando-se ditionito citrato bicarbonato (DCB) foi aplicado à amostras de solos tropicais. É conhecido que esta substância dissolve óxidos de ferro como hematita e maghemita, além de magnetita superparamagnética (SPM) ou monodomínio (SD) ou pode provocar modificação química parcial de magnetita multidomínio (MD) ou pseudomonodomínio (PSD) (Hunt *et al.* 1995, Oorschoot & Dekkers 1999). O aumento da K_{efe} foi observado para amostras de magnetita extraídas do solo através do processo químico que incluía o uso de DCB, relacionado à dissolução de maghemita e remoção da superfície oxidada de cristais de magnetita (Fischer *et al.* 2007).

O fator de assimetria para os escapos decresce com o aumento da temperatura entre 5 e 30K ($A_w = 2,2-1,4$) mantendo-se constante a partir de então ($A_w = 1,2-1,4$) (Figura IV.1.10c). Para o flagelo o mesmo comportamento de A_w é observado, exceto em 150K quando há um aumento deste valor ($A_w = 1,80$) (Figura IV.1.10c). Os valores de A_w encontrados para os extratos são menores indicando um linha mais simétrica que das partes inteiras, e que aumenta com a temperatura (Figura IV.1.10c). O valor > 1 para escapos e flagelos pode ser um indicativo da presença de magnetita ou maghemita SD e MD. ΔH_{pp} decresce quando a temperatura aumenta nas três amostras, e um pico a $T = 30K$ é observado para escapos (Figura IV.1.10b). S , normalizado para 2 antenas, do escapo é menor do que o do flagelo, possuindo valores que variam entre $1 \cdot 10^3$ a $1 \cdot 10^6$. Na curva observa-se um aumento entre 5 e 30 K, a partir do qual estes valores começam a decrescer. S mantém-se constante entre 60 e 90K aumenta até 110 K e decresce até 300 K. Já os valores do flagelo variam entre $5-8 \cdot 10^5$. A curva se mantém constante entre 5-30K, decresce até 50K, quando começa a aumentar com a temperatura, quase linearmente. Já no extrato os valores de S variam de $4-6 \cdot 10^5$ decrescendo com o aumento da temperatura a partir de 20K.

Os valores de H_r e ΔH_{pp} para todas as faixas de temperaturas entre as partes das antenas e seus extratos revelam o alargamento das linhas do extrato, após tratamento com NaOCl (extração), e um deslocamento da linha CA para campos maiores o que sugere

partícula de diâmetro magnético menor. Estes diâmetros médios das partículas, foram estimados utilizando a expressão dada na (eq. I.3.9). A Figura IV.1.11 mostra a variação de ΔH_{pp} com o inverso da temperatura para escapos, flagelos e extratos de antenas.

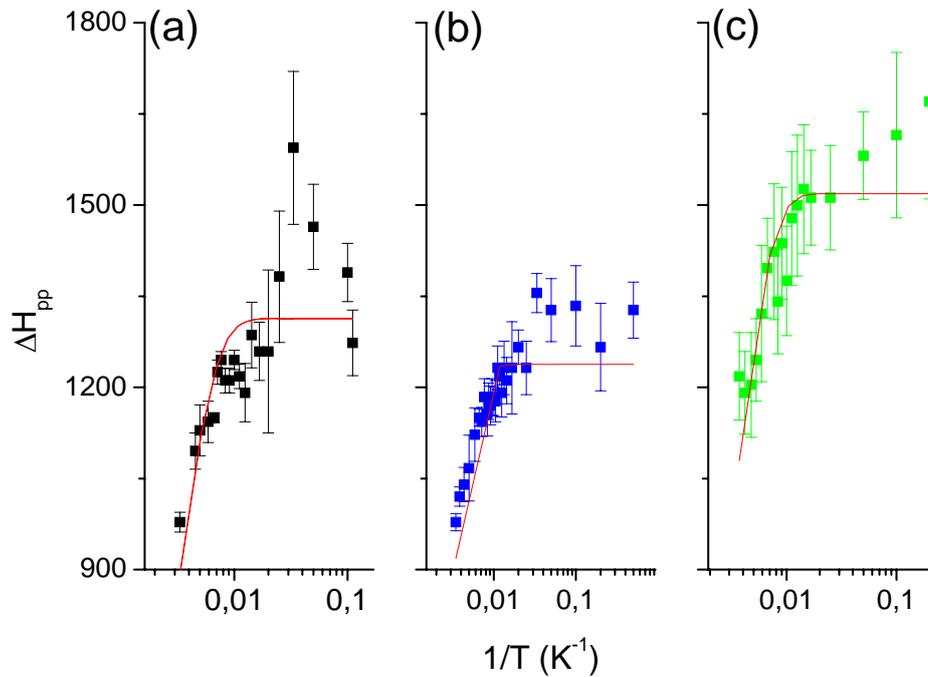
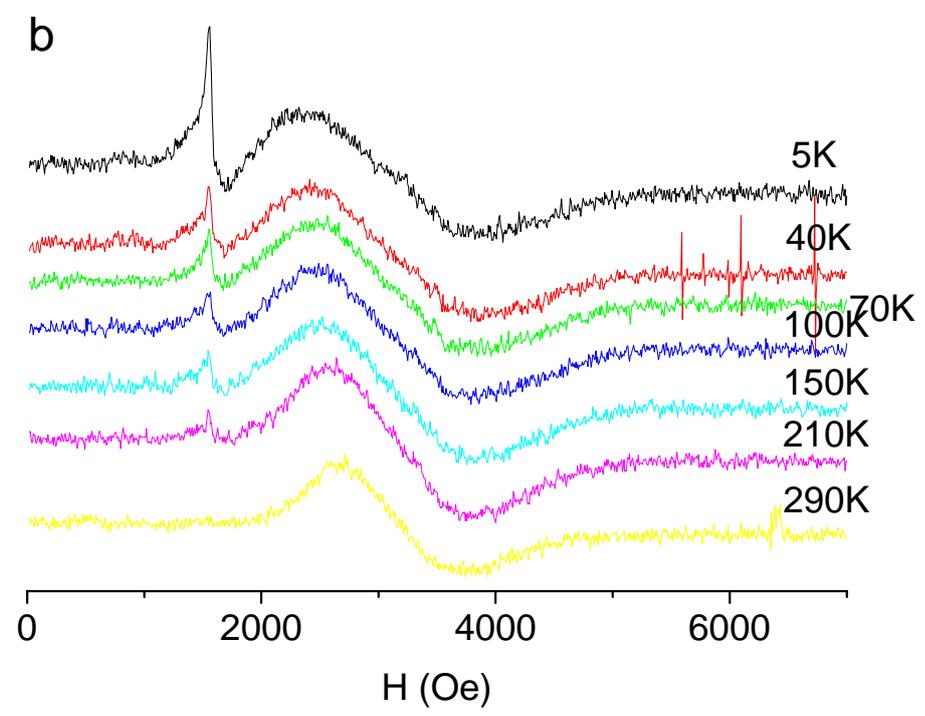
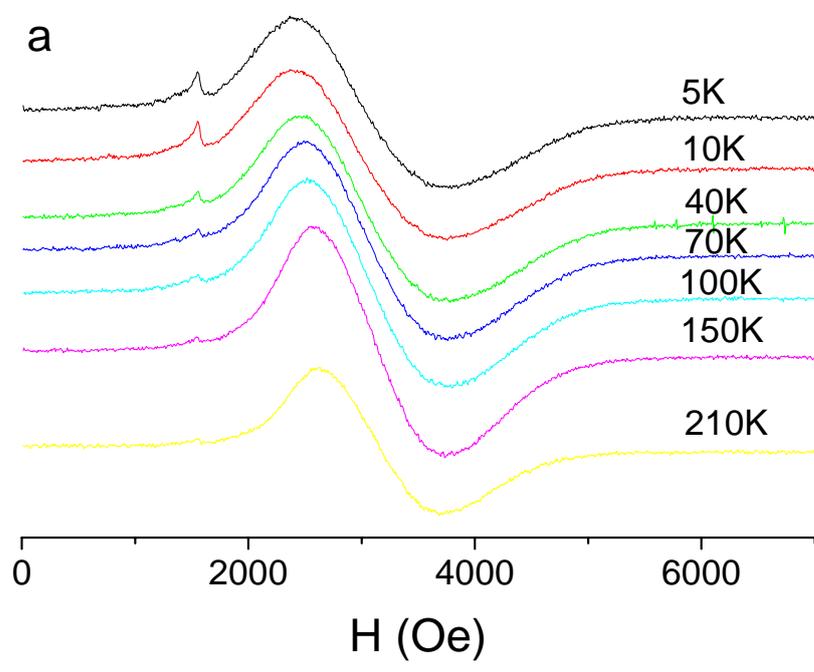


Figura IV.1.11: Variação da largura de linha com o inverso da temperatura para (a) escapos, (b) flagelos e (c) extratos de antenas. Linha cheia é o ajuste com a eq. I.3.9, $\Delta H_0 = 1313 \pm 28$ Oe, 1238 ± 18 Oe e 1519 ± 25 Oe e $KV = (6,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-14}$ erg, $(7,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-14}$ erg, e $(6,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-14}$ para escapos, flagelos, e extratos de antenas, respectivamente.

Os dados que melhor se ajustam em toda a faixa de temperatura são os de extratos de antena. Utilizando os valores de K_{efe} obtidos, diâmetros médios de $14,5 \pm 0,6$, $14,8 \pm 0,2$ e $11,4 \pm 0,4$ nm, foram obtidos para escapos, flagelos e extratos de antena, respectivamente.

Os extratos magnéticos de 37 cabeças, 49 tórax e 50 abdomens foram medidos. É importante mencionar que os parâmetros obtidos podem ser diferentes dos obtidos para partes intactas. A variação térmica dos espectros destes extratos está mostrada na **Figura IV.1.12 a, b e c**, respectivamente.



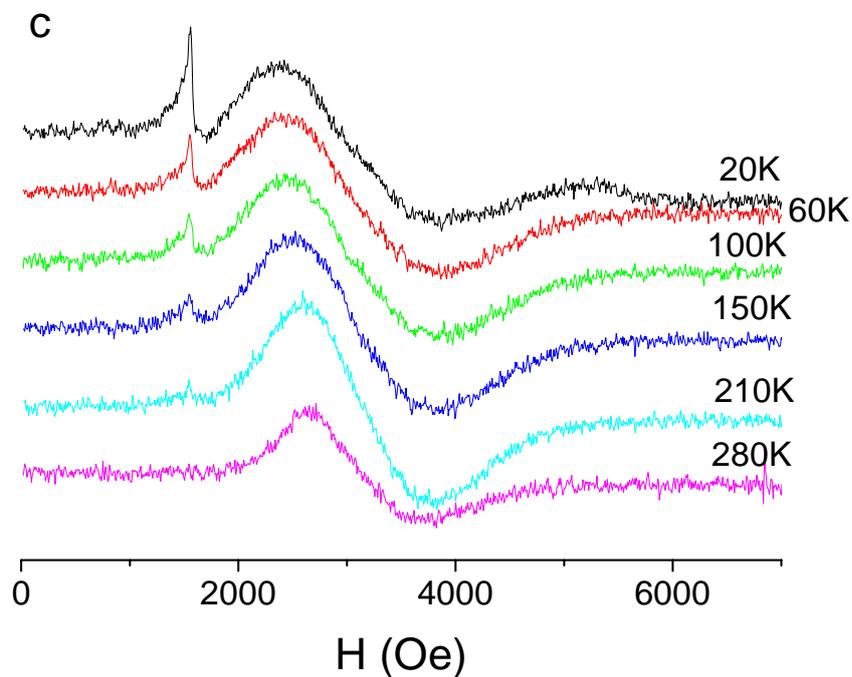


Figura IV.1.12: variação térmica dos espectros de (a) cabeças, (b) abdomens e (c) tórax. Pmw: 20mW, ganho: $6,3 \cdot 10^4$ e 1 varredura.

Os espectros são compostos de uma linha larga na região de campo alto, em torno de $g \sim 2$. A intensidade da linha nos extratos da cabeça é maior do que a do abdômen que é maior do que a do tórax. O sinal em $g = 4,3$ associado ao Fe(III) está presente a baixas temperaturas (5 – 230K). Um ombro é observado em um campo em torno de 5000 Oe nos espectros de tórax no intervalo de 5 - 40K e desaparece subitamente a partir de 50 K (Figura IV.1.12c).

A variação térmica dos parâmetros de RFM dos extratos de cabeça, tórax, abdômen e antenas, para fins de comparação, estão mostrados na Figura IV.1.13. Hr de antenas está na região de campos mais altos em comparação com os extratos de outras partes do corpo da formiga, que apresentam comportamentos similares. ΔH_{pp} decresce quando a temperatura aumenta para todos os extratos (Fig III.1.13b), enquanto o comportamento de S (Fig III.1.13d) é similar entre eles, com valores de S das cabeças 4 a 8 vezes maior que

das outras duas partes para temperaturas menores do que 190K. O fator de assimetria para os todos os extratos indica que as curvas obtidas são assimétricas (A maior ou menor que 1) para quase toda a faixa de temperaturas medida (Figura IV.1.13c).

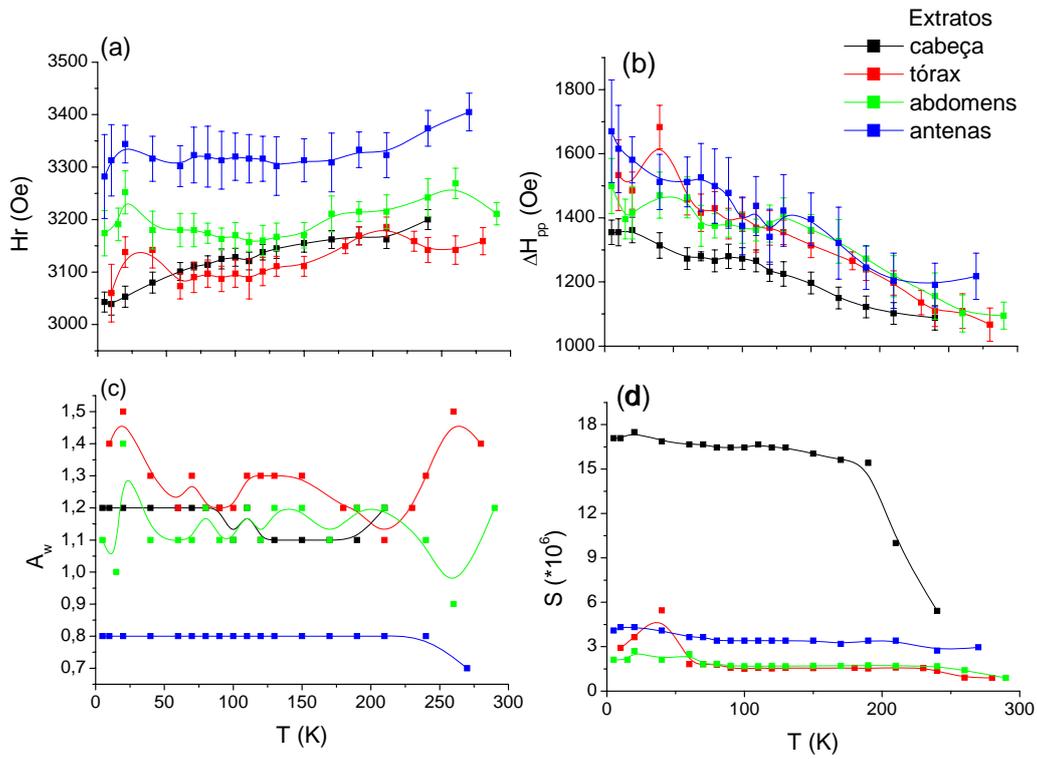


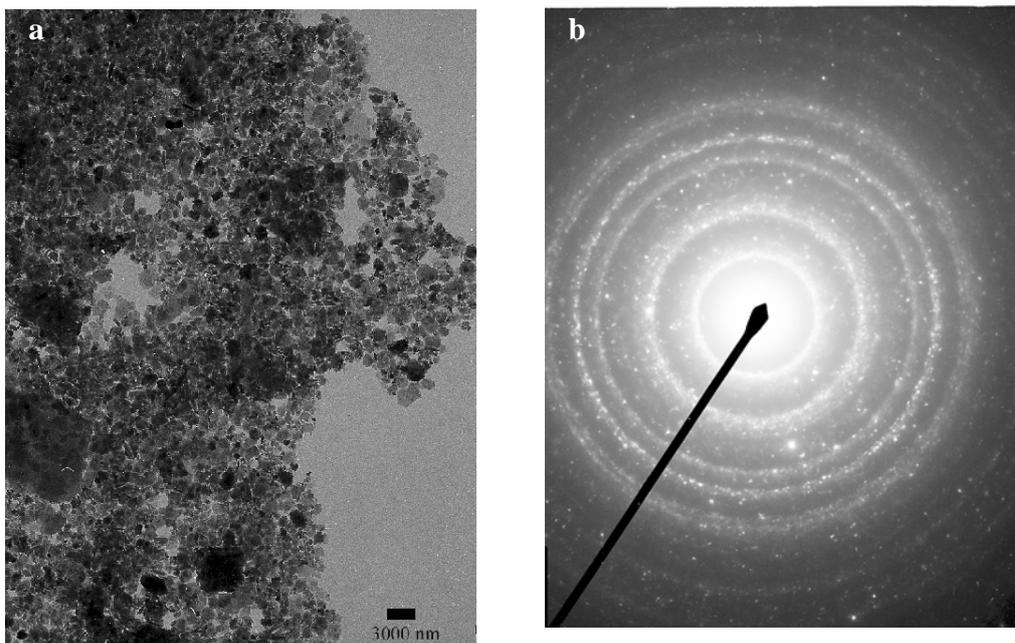
Figura IV.1.13: Variações térmicas dos parâmetros de RFM de extratos de cabeça, abdômen, tórax e antena de formiga. (a) campo de ressonância, (b) largura de linha ΔH_{pp} H_r , (c) fator de assimetria A_w e (d) 2ª integral da derivada da absorção S obtida pelo winepr.

Microscopia

2. Extração magnética

Os extratos de Set/06 de todas as partes do corpo da formiga consistiram de diferentes quantidades de um material concentrado vermelho alaranjado localizado no fundo dos ependorfs, com o abdômen possuindo o maior e a antena o menor volume de material. A [Figura IV.2.1](#) mostra exemplos de micrografias de extratos de cada uma das partes do corpo da formiga e de uma amostra de solução de solo (veja materiais e métodos). Em todos os casos, exceto antenas, partículas com distintas morfologias, tais como esferoidal, cúbica, hexagonal e agulha, além de aglomerados foram observados.

Observam-se partículas com tamanhos entre 50 e 6000 nm e aglomerados com tamanho de 14000 nm ou menores. A análise de dados de espectroscopia de energia dispersiva em elétrons (EDS) das partículas mostradas na [Figura IV.2.1](#) identificaram Fe/O, Si/Al/O, Fe/Ti/O e Ti/O como sendo componentes destes materiais. Padrões de difração destas partículas e das encontradas na solução de solo foram obtidas e seus espaçamentos interplanares foram calculados e mostrados na [Tabela IV.2.1](#) junto com valores de alguns óxidos ferro (Joint Committee for Powder Diffraction Standards (JCPDS)).



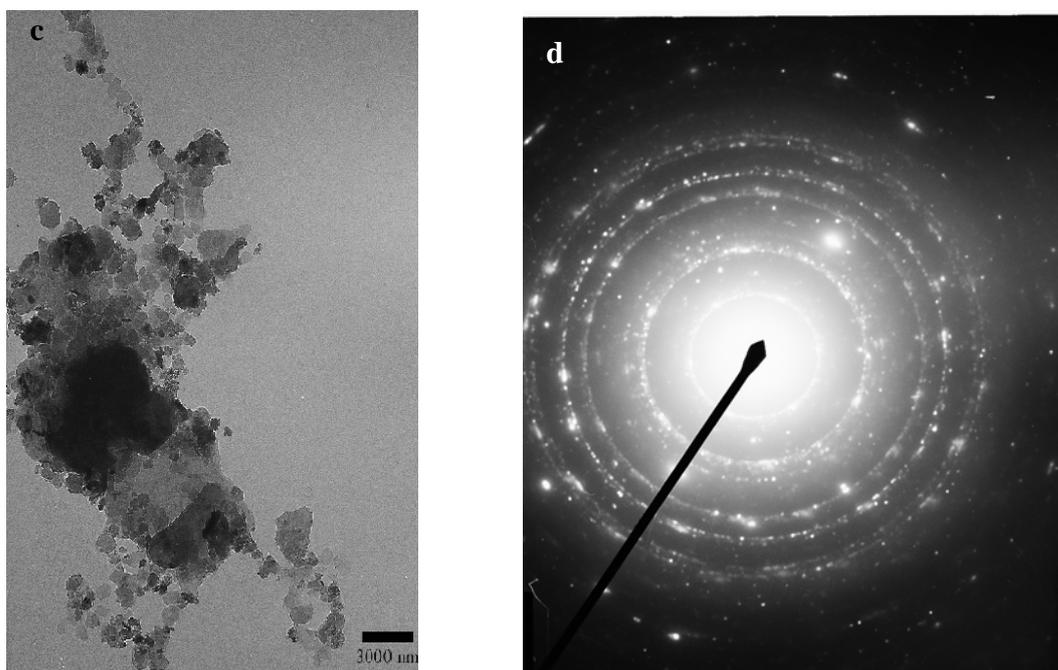


Figura IV.2.1: (a) Solução de solo e seu respectivo padrão de difração (b). Micrografias de partículas de tórax obtidas pelo método de extração magnética (Set/06) (c) e seu padrão de difração (d).

Os espaçamentos da solução de solo são comuns a muitos compostos de Al/Si/O ou misturas destes com outros elementos tais como Mn, Na e Ca (AMCSD) além de Fe/O, assim como os extratos das partes das formigas. Não foi possível identificar óxidos de ferro presentes nos extratos porque a abertura mínima disponível (100 μm) do microscópio Jeol JEM 100 CX não era suficiente para obter padrões de difração de uma única partícula. O indicativo da presença de partículas contendo ferro e oxigênio vem somente das medidas de EDS. NaCl foi identificado nos extratos de antena (Sep/06) através dos padrões de difração de elétrons obtidos.

Para reduzir a quantidade de material vindo do solo, uma nova coleta (Maio/2007) foi feita e o mesmo protocolo de extração foi aplicado. Observou-se uma forte redução na quantidade do precipitado laranja observado no primeiro grupo de amostras e a ausência, à olho nu, do mesmo nos extratos de antena. Seguidas lavagens em água destilada

eliminaram os cristais de NaCl devido à contaminação por NaOCl, embora o material orgânico não tenha sido completamente removido.

Magnetita d (nm)	Hematita d (nm)	Goetita d (nm)	Solo (solução) d (nm)	Abdômen (Sep06) d (nm)	Tórax (Sep06) d (nm)	Cabeça (Sep06) d (nm)	Antena (Sep06) d (nm)
4.85 (8)		4.18	4.28	4.28	4.28		4.28
	3.67	3.38					
2.97 (30)				3.09		2.97	
	2.69	2.69				2.65	
2.53 (100)	2.51	2.58/2.53					2.53
2.42 (8)		2.48/ 2.45	2.42	2.42	2.42		
	2.23	2.30	2.32			2.32	
	2.20	2.25/2.19	2.14		2.14		
2.01 (20)	2.07	2.09/2.01/1.92				1.97	
1.71 (10)	1.84	1.80/1.77/1.72					
1.62 (30)	1.69/1.63	1.69/1.66/1.60	1.64		1.64		

Tabela IV.2.1: Comparação das distâncias interplanares experimentais (d), em nanômetros (nm), dos extratos do corpo da formiga e soluções do solo e três óxidos de ferro. As porcentagens entre parênteses são as intensidades relativas medidas a partir de difração de raios-X de amostras policristalinas e estão diretamente relacionadas a probabilidade na qual cada ponto de difração apareça em qualquer padrão de difração. Estes dados foram obtidos do Joint Committee for Powder Diffraction Standards (JCPDS). Os números correspondentes aos óxidos de ferro são 19-629 para magnetita, 13-534 para hematita e 29-713 para goetita.

Uma grande quantidade de partículas de Fe/O com tamanhos de 50 nm (Figura IV.2.2a) foi observada nos extratos magnéticos de antena de maio/07 com um decréscimo significativo na quantidade de partículas Si/Al/O, quando comparado com os extratos de outras partes do corpo. Do conjunto de padrões de difração obtidos somente dois puderam dar informações sobre os espaçamentos interplanares. O primeiro, mostrado na Figura IV.2.2b possui espaçamentos de 0,25 nm e 0,1485 nm. Estes valores são comuns a quase todos os óxidos de ferro e a única forma de diferenciá-los seria através da simetria. Neste caso, 3 óxidos de ferro se adequam: hematita (Fe_2O_3 , trigonal), ferroxita ($\gamma\text{-FeOOH}$, hexagonal) e ferrihidrita ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, hexagonal). Estes três óxidos são facilmente encontrados em solos. A ferrihidrita comumente tem estrutura esférica pobremente cristalina, de até 50 μm , em agregados globulares. A maioria das ferridritas contém silício, quimicamente adsorvido. A ferroxita forma-se pela rápida oxidação de compostos ferrosos, aparece em agregados com partículas de argila e transforma-se em goetita na presença de ar.

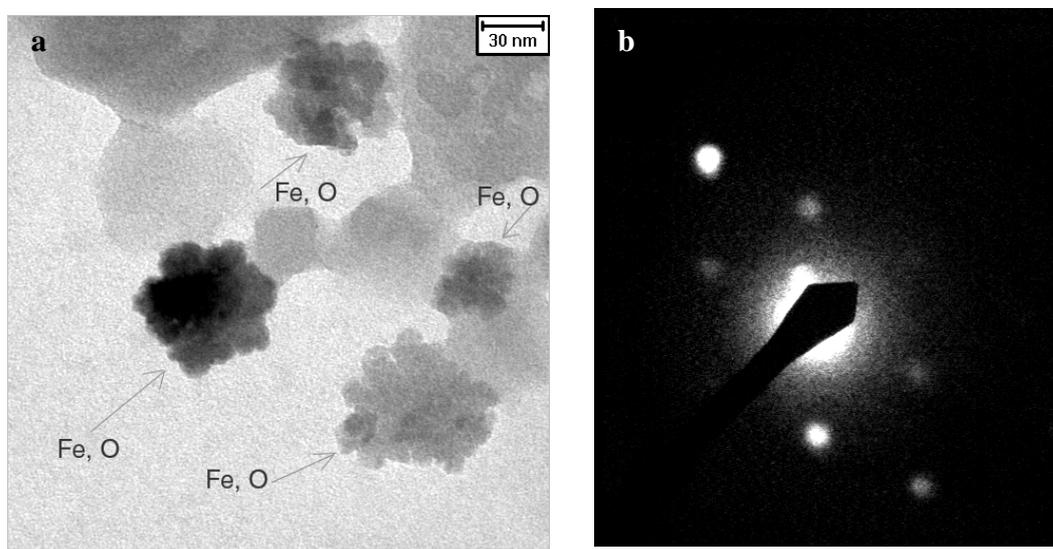


Figura IV.2.2: (a) imagem de campo claro obtida por MET de partículas Fe/O de 50 nm encontradas nos extratos magnéticos de antena da amostra de maio/07 identificada como hematita a partir de seus padrões de difração. (b) padrão de difração de um único cristal de óxido de ferro.

EDS identificando estas partículas como Fe/O estão mostradas na **Figura IV.2.3a**. O segundo padrão de difração mostra simetria hexagonal na (**Figura IV.2.3b**). Os espaçamentos de 0,25 nm junto com o ângulo medido ($\theta = 60^\circ$) entre duas direções, isto é, o ângulo entre dois planos cristalinos, foram utilizados para identificar o cristal como de hematita.

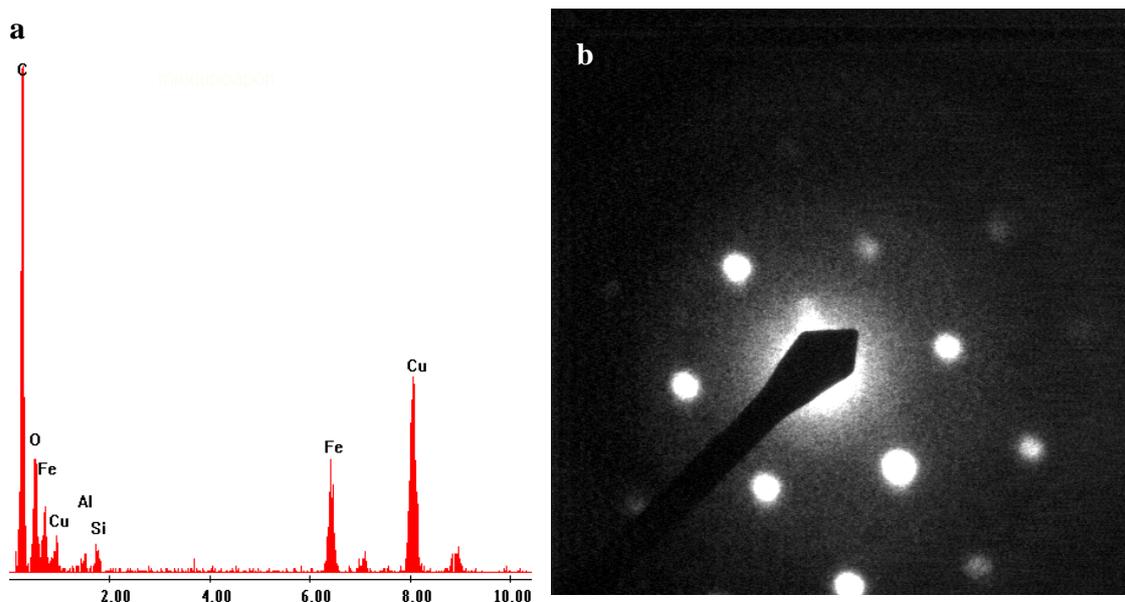


Figura IV.2.3: (a) Dados de EDS obtidos a partir de um único cristal contendo Fe e O. (b) padrão de difração de um destes cristais.

Já que partículas provenientes do solo podem estar presentes nos extratos magnéticos, a origem biogênica dos monocristais só pode ser mostrada através da detecção deste material dentro de tecidos bem preservados.

3. Reação azul da Prússia e de Turnbull

A reação do azul da Prússia (PB) ou de Turnbull (TB) permite a identificação de regiões de tecido que contém ferro através da reação de ferro(i)cianeto de potássio com os íons Fe(III) e Fe(II), respectivamente. O produto resultante desta reação é analisado por microscopia óptica. O aumento mínimo de 20x (lente objetiva) foi necessário para se detectar as regiões azuis das amostras, regiões com traços da ordem de micra. Aumentos

maiores são necessários para visualizar melhor a região contrastada e seu entorno. O aumento real (com a contribuição da binocular e objetiva) foi obtido tirando-se uma foto da barra de escala.

Nas primeiras medidas os cortes foram observados logo após a aplicação do reagente. Estas mesmas lâminas foram observadas após 10 min, 1 hora, 3 horas e 4 dias. Em alguns casos, apareceram pontos azuis após um determinado intervalo de tempo em locais onde anteriormente não havia nada. Excesso de reagente favorece a formação de cristais de ferri(o)cianeto de potássio que dificultam ou até inviabilizam a observação das amostras.

Tecidos adequadamente fixados garantem que sítios de reação não se moverão através do líquido reagente. A fixação dos cortes à lâmina do microscópio deve ser garantida e a lavagem da lâmina após aplicação do reagente deve ser feita para evitar a formação dos cristais de ferri(o)cianeto de potássio.

A reprodutibilidade da reação para a mesma região de outras amostras foi testada. Para este fim, cortes de amostras com a mesma orientação, transversal ou longitudinal à antena, das amostras, é fundamental. Do total de amostras de cabeça+antenas observadas (8), com distintas orientações, somente em duas, foram encontradas regiões de Fe(III) e Fe(II): na cabeça e na junção entre a cabeça e o escapo (**Figura IV.3.1**).



Figura IV.3.1: corte longitudinal ao escapo de uma amostra emblocada em SPURR mostrando a presença de Fe^{3+} na conexão entre a cabeça e o escapo. Seta aponta para uma das regiões azuis encontradas.

Aproximadamente a mesma região, mas não um corte com a mesma orientação, foi identificada em outras 6 amostras de cabeças com antenas, mas Fe(II) foi identificado em somente uma amostra. Sítios de concentração de Fe³⁺ foram encontrados em algumas regiões da cabeça. No entanto, como estes pontos estão em regiões distintas de corte em diferentes amostras podem ser considerados como artefatos.

Uma mesma região de algumas amostras foram observados através de microscopia ótica e eletrônica. A conexão entre o escapo e o pedicelo está mostrada como exemplo na **Figura IV.3.2**.

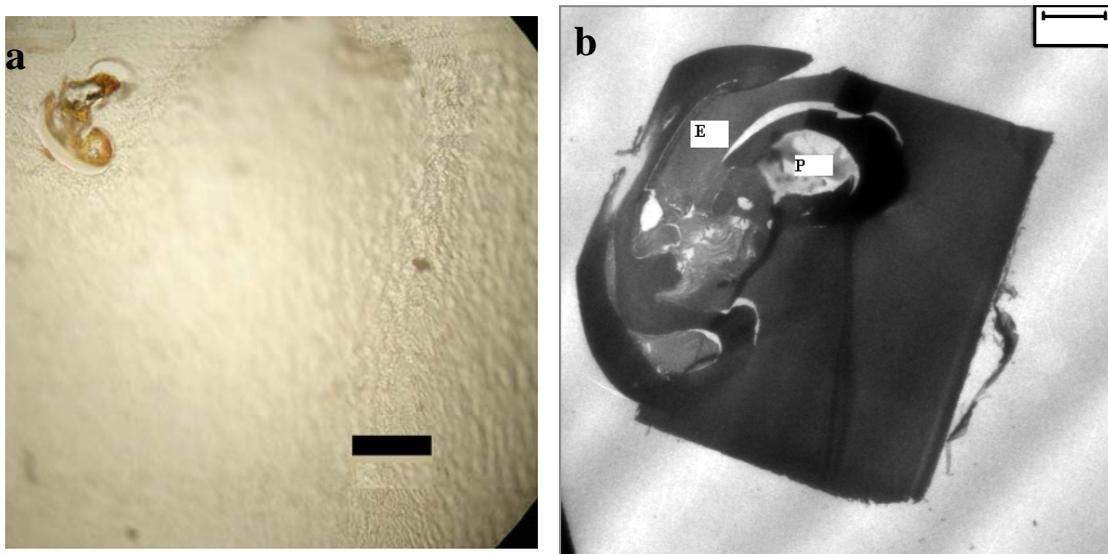


Figura IV.3.2: conexão entre escapo e pedicelo. (a) corte oblíquo para microscopia ótica, barra de escala: 200 μm e (b) para MET. Escapo (E) e pedicelo (P), barra de escala: 60 μm .

Na microscopia ótica nenhuma reação que indicasse a presença de Fe²⁺ foi observada para a região de conexão entre o escapo e o pedicelo. Diferentes óxidos de ferro foram encontrados nesta mesma região e em cortes subsequentes por MET e a não observação da reação pode ter sido devido a um aumento insuficiente para observação desta região ou ausência de magnetita.

Melhoras significativas no método de preservação das amostras foram observadas a partir de mudanças implementadas no método de preparação, como no exemplo do corte transversal de um segmento do flagelo (**Figura IV.3.3**). Nota-se que o tecido, ou seja, toda

região interna à cutícula está preservada na amostra emblocada em kit de baixa viscosidade da Agar (Figura IV.3.3b) sendo possível observar os nervos antenais e a epiderme, localizada logo abaixo da cutícula. No entanto, sítios de reação não foram encontrados neste grupo de amostras.

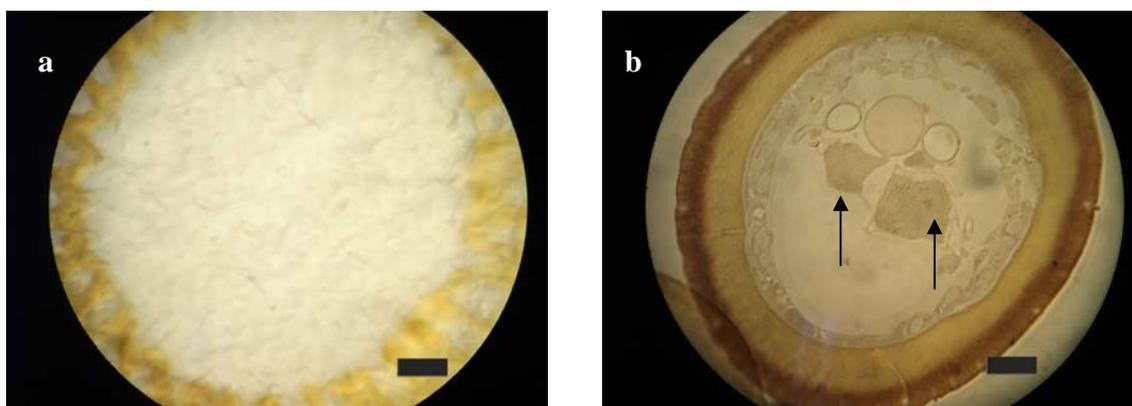


Figura IV.3.3: semi-seções transversais de segmentos (10 μm) do flagelo de formiga *P. marginata*. (a) amostra emblocada em EPON. (b) amostra desidratada em álcool e acetona emblocada em kit de baixa viscosidade da agar. Setas apontam para nervos antenais. Barra de escala: 20 μm .

O método de identificação de ferro através da reação azul da Prússia/Turnbulls em cortes semi-finos realmente ajudaria a determinar a região que deve ser posteriormente observada por microscopia eletrônica de transmissão, no entanto, problemas no processo de preparação de amostras, tais como má fixação ou infiltração, uso da quantidade adequada do reagente por tempo limitado podem prejudicar ou não permitir a observação da reação nos cortes. Também a perda de material biológico no momento do corte pode também estar implicada na perda de óxidos de ferro. A falta de reprodutibilidade para a maior parte das amostras também dificultaram uma análise mais precisa das imagens obtidas.

Um outro fator importante que afetaria reprodutibilidade dos dados é a casta a que pertence o inseto. Slowik e Thorvilson (1996) aplicaram o método de contrastação do azul da Prússia para identificar regiões de concentração de Fe(III) nos abdômens de operárias pequenas, médias e grandes, rainhas e alados da espécie de formiga *Solenopsis invicta*. Eles verificaram que a consistência e quantidade de ferro encontrados em cada casta foi associada às atividades desenvolvidas por cada grupo e o grupo que possui a maior

quantidade de ferro encontrado é o das operárias grandes, que desenvolvem tarefas do lado de fora e longe do ninho.

4. Pelos sensores

4-i) Identificação de sensilas

A morfologia da antena foi analisada através de (MEV) e (MET). Sensilas de seis antenas foram classificadas e, sensilas trichodea, encontradas em maior número estão presentes em todos os segmentos e a quantidade aumenta a medida em que se aproxima das partes mais distais da antena. Os tamanhos destas sensilas variam de 9 a 43 μm . Sensilas basiconica, coeloconica, chaeticum, campaniforme, poros e pelos de Boehm foram também observados.

Oito regiões de conexão entre a cabeça e escapo foram observadas. Na região que forma o bulbo articular, ou a junção monocondílica (Figura IV.4.1a), grupos de pelos de Boehm são visíveis. Não é possível determinar a quantidade exata de pelos presentes já que esta junção está inserida na cabeça do inseto. Uma tentativa de remover-se esta junção resultou em perda de parte dela, mas, pode-se ainda observar a distribuição de grupos de pelos de Boehm com diferentes orientações e tamanhos (Figura IV.4.1b).

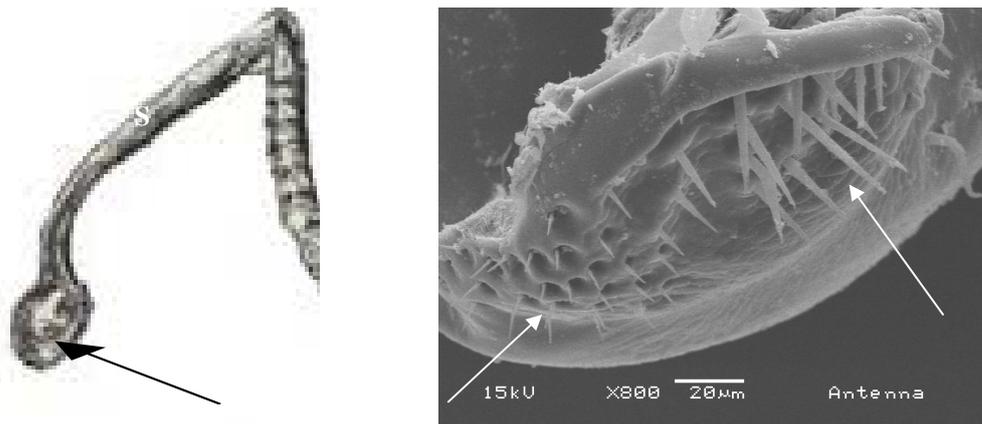


Figura IV.4.1: (a) um diagrama de parte da antena. seta aponta para o bulbo, S é o escapo. (b) MEV de parte do bulbo articular, ou junção monocondílica, de uma operária de formiga *Pachycondyla marginata*. Observe parte da distribuição dos pelos de Boehm (setas brancas).

Em outra região da junção entre escapo e cabeça (Figura IV.4.2 a) foram observados 10 pelos de Boehm com comprimentos, que variam de 7 a 10 micra e diâmetro de 1 micron (Figura IV.4.2 b), formando uma placa. Além disso, 11 sensilas campaniforme são visíveis.

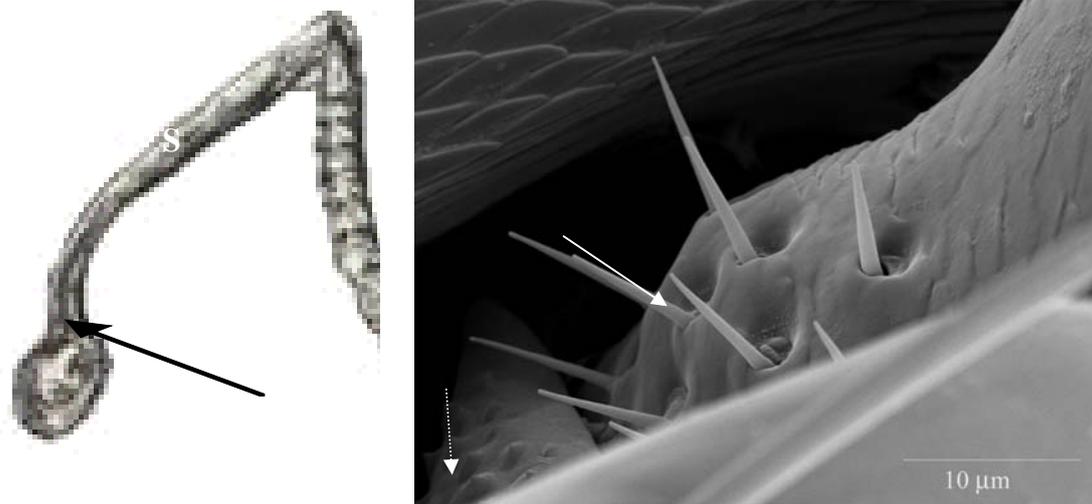


Figura IV.4.2: (a) Diagrama da conexão entre cabeça e escapo (S). Seta indica região observada em (b) MEV dos pelos de Boehm (seta) e sensilas campaniforme (seta pontilhada) podem ser observadas.

A distribuição de pelos no escapo e na junção entre este e o pedicelo é mostrada a seguir: próximo à conexão com a cabeça sensilas chaetica com comprimentos variando de 30 a 93 micra e diâmetro de 4 µm são visíveis, e são identificadas através da presença de um socket (Figura IV.4.3). O diâmetro deste socket varia entre 9 e 11 µm. Além destas, sensilas trichodea também foram observadas com comprimentos entre 9 e 48 µm e diâmetros entre 1 e 4 µm. Uma sensila basicônica e poros foram observados na parte proximal do escapo.

A região do escapo e junções de uma única operária muito maior do que as outras analisadas foram observadas por MEV. Nestas formigas, duas sensilas basicônica foram observadas na superfície do escapo, com comprimento de 14 micra e diâmetro de 3 micra. Mais de 80 sensilas trichodea com comprimentos entre 20 e 43 micra e diâmetros de 3 micra foram observadas.

Poros foram observados em regiões nas quais quase não havia pelos. Estes poros podem estar relacionados à presença de glândulas exócrinas (Isidoro *et al.* 2000), sensilas coeloconica ou ampulacea (Renthal *et al.* 2003).

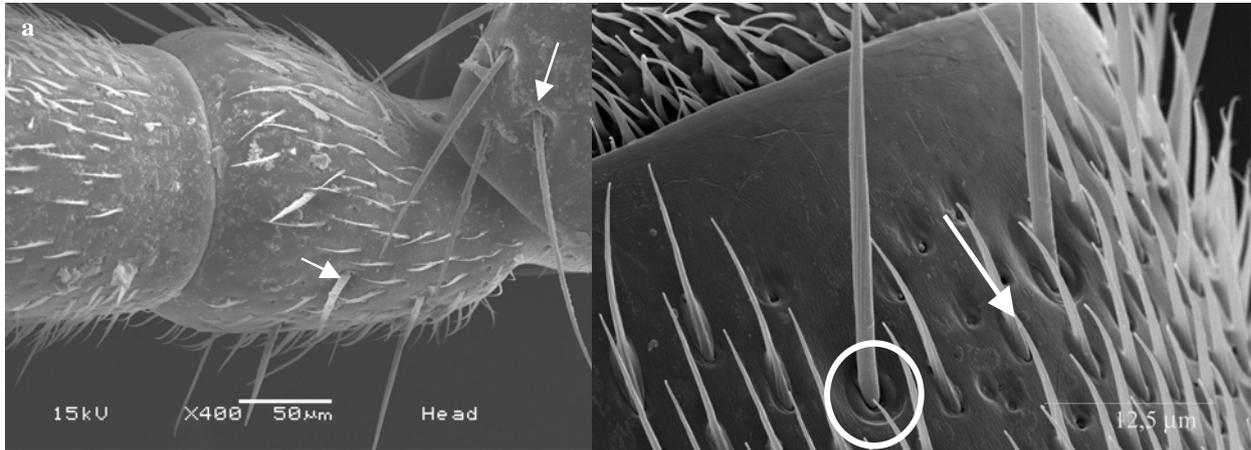


Figura IV.4.3: (a) Micrografia obtida por MEV do pedicelo (centro), parte do terceiro segmento (à esquerda) e parte final do escapo (à direita). Setas apontam para sensilas chaetica. O outro tipo de sensila, largamente distribuída sobre a superfície dos dois segmentos vistos na micrografia são as sensila trichodea (b) Micrografia obtida por MEV de um segmento antenal mostrando o socket de uma sensila chaetica (circulo em volta da estrutura). Compare com a sensila trichodea (seta branca aponta para um destas sensilas) onde nenhum socket é observado.

Em todas as antenas, na conexão entre o escapo e pedicelo, algumas sensilas trichodea e chaetica são observadas. Além destas, observa-se na parte distal do escapo poros, sensila campaniforme e sensila coeloconica. Em uma amostra, 12 pelos de Boehm foram observados, com comprimentos entre 6 e 12 micra e diâmetro entre 2 e 3 micra.

Sensilas trichodea estão largamente distribuídas por toda a superfície do pedicelo e flagelo. Uma estimativa da quantidade de sensilas trichodea presente nos segmentos foi feita dividindo a superfície do segmento considerado como um cone de diâmetro igual ao da região central dividido pela densidade de sensilas na área central do segmento.

Foram estimadas 182-210 sensilas trichodea no pedicelo e poros e sensilas basicônica também foram observadas neste segmento. Na parte distal do pedicelo um anel

de sensilas chaetica pode ser observado (Figura IV.4.4). Um anel de sensilas campaniforme, frequentemente observado em outras espécies de formigas e abelhas (McIndoo 1922, Masson & Gabouriaut 1973, Tsujiuchi *et al.* 2007) não foi observado, mas um par estava presente.

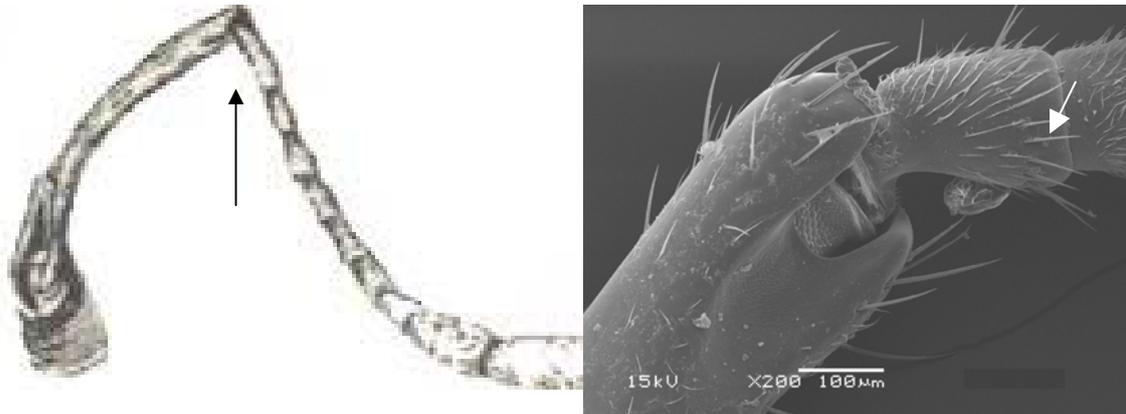


Figura IV.4.4: (a) Diagrama de antena de formiga mostrando escapo, pedicelo e flagelo. A seta aponta para o segmento pedicelo. (b) MEV da região de conexão entre escapo e pedicelo e pedicelo e 3º segmento. Na parte mais distal do pedicelo, a seta aponta para uma sensila chaetica. Observe que várias sensilas chaetica estão presentes nesta linha formando uma espécie de anel nesta região.

Na operária cujo tamanho é muito maior que as demais, sensilas tricodea constituem a maior parte dos pelos encontrados em todos os segmentos no flagelo. Os tamanhos variam entre 13 e 17 µm e o diâmetro é de 1 µm. As sensilas chaetica estão em menor quantidade e localizam-se principalmente na parte distal dos segmentos. Sensilas basicônicas misturam-se às trichodea na proporção estimada de > 50 entre o segundo tipo e o primeiro. Aparentemente estas sensilas estão regularmente distribuídas na superfície deste segmento antenal (Figura IV.4.5). A sensila coeloconia, que aparece como um pelo cortado, está presente nas partes distais de alguns segmentos flagelares. Poros também estão presentes.

Diferenças de casta, incluindo diferenças entre machos e fêmeas, podem ser detectadas através de estudos da morfologia da antena. Um estudo prévio realizado por Cassill e Tschinkel (1999) com formigas *Solenopsis invicta* mostraram uma correlação

entre o tamanho destes insetos e a tarefa atribuída a eles: as maiores operárias se especializam no forrageamento enquanto as menores cuidam dos ovos e pupas. Assim, formigas de diferentes tamanhos seriam sensíveis a diferentes estímulos olfatórios. No entanto, apesar da diferença de tamanho entre este indivíduo em particular, da espécie *Pachyconcylla marginata*, e o resto das amostras observadas, não se observou qualquer característica nas antenas desta formiga que a distinguisse das demais.

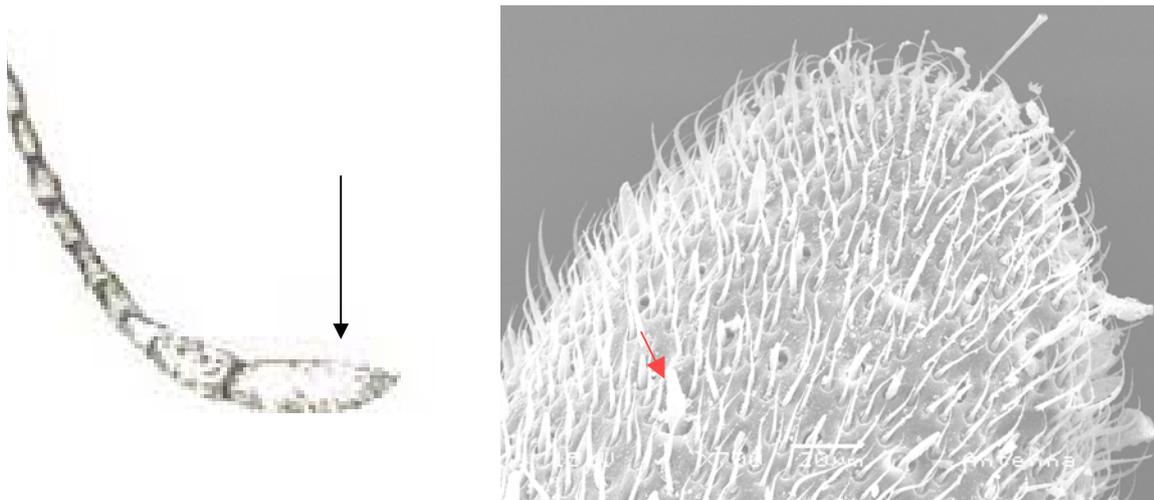


Figura IV.4.5: (a) diagrama mostrando flagelo antenal. Seta aponta para o último segmento. (b) MEV de parte deste segmento. Seta aponta para sensila basicônica.

Todos os tipos de sensila, exceto a campaniforme e os pelos de Boehm, estão presentes em cada segmento antenal e quanto maior a distância do segmento em relação à cabeça, maior o número e a densidade de pelos no segmento. Especialmente, no caso das sensilas trichodea observa-se o aumento da quantidade de pelos de algumas unidades no escapo para algumas centenas e até milhares quando nos aproximamos da parte mais distal da antena. As sensilas trichodea e basiconica possuem funções basicamente olfatórias. Estudos eletrofisiológicos com mariposas mostram que as sensilas trichodea são fortemente especializadas na detecção de moléculas voláteis (Hallberg *et al.* 1999). Já as sensilas chaetica, dependendo da posição na qual são encontradas, podem responder mais ou menos a estímulos mecânicos ou químicos. Supõe-se que as sensilas presentes no escapo e pedicelo exercem exclusivamente funções mecanosensoras, como as chaetica encontradas

no escapo e pedicelo de formigas (Isidoro *et al.* 1998), enquanto as presentes nos segmentos apicais de *Psylliodes chrysocephala* respondem a compostos químicos presentes na superfície de folhas (Isidoro *et al.* 1998). Outros tipos de mecanoreceptores presentes no escapo e pedicelo são os pelos de Boehm, distribuídos na forma de placas de pelo e as sensilas campaniforme.

4-ii) *Partículas contendo ferro nas sensilas*

Uma possível relação entre sensilas, especialmente mecanoreceptores, e a magnetorecepção pressupõe a presença de óxidos de ferro que poderiam ser detectados por neurônios presentes dentro da estrutura sensorial destas sensilas, mas que traria resultados dúbios devido a alta possibilidade de contaminação destas estruturas com material advindo do solo, especialmente para sensilas do tipo pelos. Veja exemplo de contaminação de sensilas da antena de formiga *Pachycondyla marginata* na **Figura IV.4.6**.

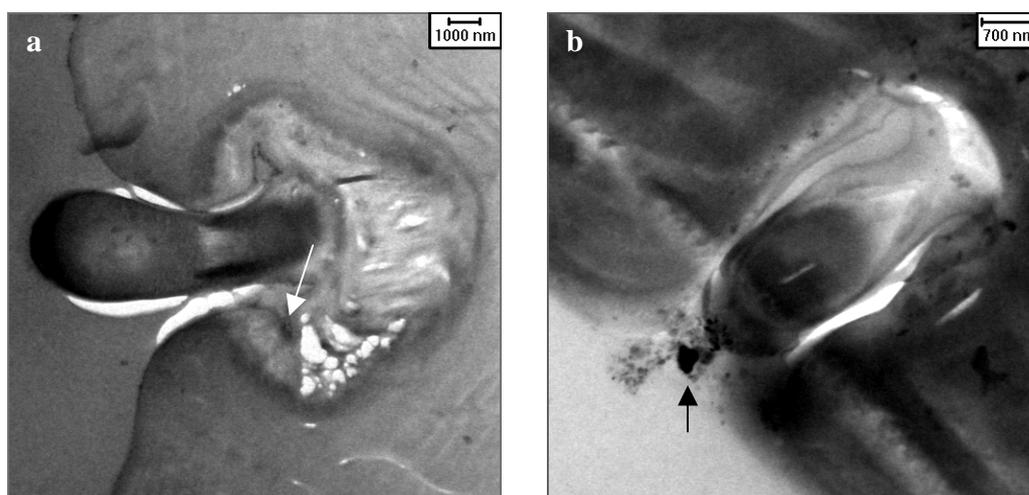
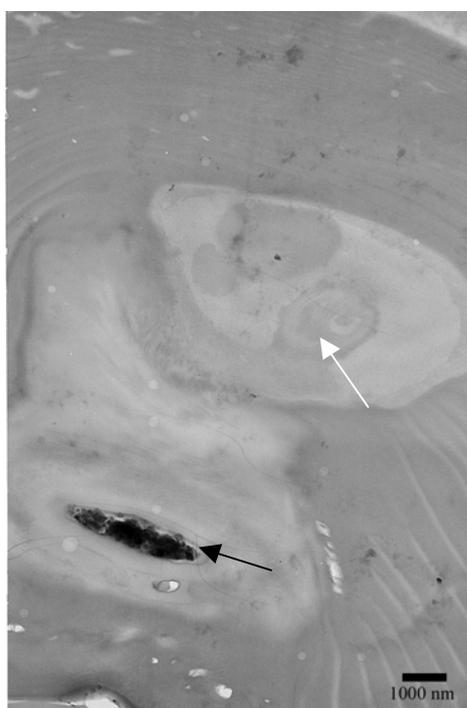


Figura IV.4.6: Micrografias obtida por MET de cortes longitudinais de sensilas do escapo contendo partículas de solo (setas). Através da análise qualitativa por EDS foi possível detectar a presença de Al, Si, Fe, O e Ti.

Medidas de MET da região mais distal do escapo, logo ao final do pedicelo mostram somente a parte cuticular de uma sensila, provavelmente mecanoreceptora, onde partículas eletrondensas são observadas. A análise elemental por EDS revelou a presença

de partículas contendo ferro, além de outras contendo (alumo)silicatos. A região analisada indica a presença de um dendrito sob a forma de um cílio (seta branca, [Figura IV.4.7](#)) ([C. Cruz-Landin comunicação pessoal](#)). Esta estrutura estaria de acordo com a função desta região da antena, servindo como estatocisto.

A análise elemental por EDS revelou a presença de partículas que contém ferro, além de outras contendo (alumo)silicatos. As partículas estão localizadas dentro de uma possível região de junção dentro da sensila ou ainda na parte mais distal do escapo, ao contrário das partículas mostradas na [Figura IV.4.6](#).



[Figura IV.4.7](#): MET de sensila mecanoreceptora do escapo. Seta preta: material eletrondenso. Seta branca dendrito sob a forma de um cílio.

Não foi possível determinar a composição ou obter padrões de difração de cada partícula isoladamente, já que estas se encontravam muito próximas uma das outras, exceto quando o corte estava parcialmente danificado. Neste caso, partículas contendo ferro, com tamanhos entre 70-300 nm foram encontradas. Foi possível somente obter espaçamentos $d = 0,25-0,26$ nm para a maior parte das partículas contendo ferro, e por esta razão nenhum óxido de ferro foi identificado. Um outro espaçamento, $d = 0,379$ nm característico

somente do ferridróxido bernalita ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (Joint Committee for Powder Diffraction Standards (JCPDS), foi encontrado para uma única partícula. A presença de (alumo)silicatos sugere que os minerais encontrados no tecido são provavelmente partículas de solo incorporadas.

5. cortes ultra-finos – MET

Cortes ultrafinos (100-200 nm) foram analisados por MET para obter a localização, dentro de tecidos, de possíveis partículas magnetoreceptoras. Partículas contendo Fe/O foram detectadas nas três junções da antena da formiga *P. marginata*: 3º segmento/pedicelo, pedicelo/escapo, mesmo não tendo sido observados em cortes semi-finos por microscopia ótica, e escapo/junção da cabeça. Imagens de campo claro de cortes ultrafinos obtidos a partir de seções transversais à junção do 3º segmento com o pedicelo (inserção da [Figura IV.5.1a](#)) são mostradas na [Figura IV.5.1 a e b](#). Na [Figura IV.5.1a](#), observa-se uma estrutura conhecida como botão quitinoso e um pequeno anel cuticular (seta na [Figura IV.5.1 a](#)), inserido dentro do botão quitinoso propriamente dito, onde os longos processos sensoriais terminam. Partículas foram encontradas dentro de invaginações cuticulares ([Masson & Gabouriaux 1973](#)) ou botões quitinosos ([Tsujiuchi et al. 2007](#)), nos quais longos processos sensoriais do escolopídeo chegam ([Hallberg 1981](#)). A [Figura IV.5.1b](#) mostra um botão quitinoso com partículas presentes em seu interior cujo espectro de EDS indica a presença de Fe, Al, Si, e O ([Figura IV.5.1e](#)). A região com partículas na [Figura IV.5.1b](#) está aumentada na [Figura IV.5.1c](#). Diversos padrões de difração foram obtidos das partículas que continham ferro em sua composição e os resultados encontrados sugerem a presença de goetita e/ou hematita. A maior parte das partículas Fe/O não puderam ser identificadas, pois os padrões de difração obtidos se originaram de misturas de cristais, impossibilitando a identificação. Como exemplo, o padrão de difração ([Figura IV.5.1d](#)) da partícula de goetita indicada pela seta na [Figura IV.5.1c](#) é mostrado. Tal distribuição de partículas variou entre os diferentes botões, entre diferentes amostras e, provavelmente é causada pelo desconhecimento da distribuição das mesmas por toda a estrutura.

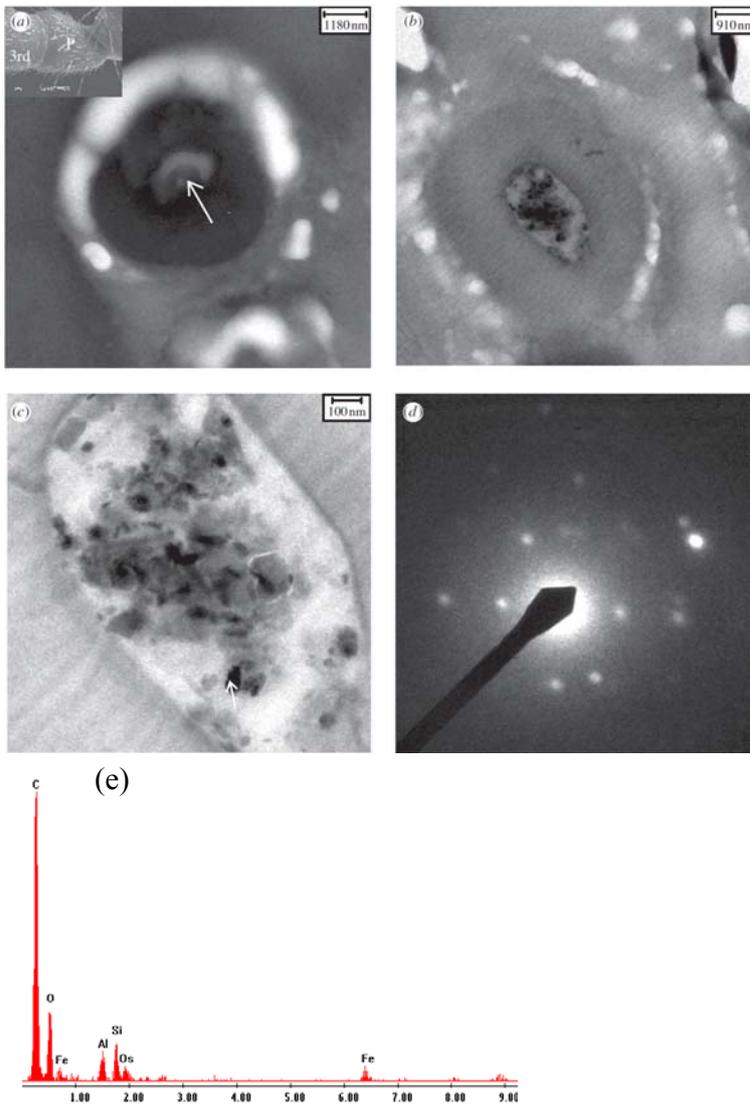


Figura IV.5.1: Imagens obtidas por MET de cortes transversais ultrafinos da junção entre o terceiro segmento e o pedicelo. (a) botão quitinoso (diâmetro, 4-5 μm). A seta branca aponta para um longo processo sensorial (diâmetro, 1 μm). Inserção: MEV da antena de *P. marginata*, mostrando o terceiro segmento (3 $^\circ$) e o pedicelo (P). (b) Outro botão quitinoso contendo partículas. (c) Região aumentada do botão quitinoso na qual cristais de hematita e goetita (seta) além de silicatos / alumosilicatos foram identificados. (d) Padrão de difração do cristal de goetita (seta em c). $d = 0,338; 0,256$ e $0,257$ nm. (e) EDS da região da figura (b)

O órgão de Johnston consiste de grupos de células sensoriais cujas fibras nervosas correm em dois nervos antenais e cujas fibras sensoras estão ligadas a botões cuticulares na membrana articular entre o pedicelo e o 3º segmento. Localizado no pedicelo, o órgão de Johnston funciona como um órgão mecanosensor, percebendo alterações do flagelo em relação a este segmento antenal. Já que óxidos de ferro foram encontrados nestes botões quitinosos e distintas funções são atribuídas a este órgão, uma função magnética pode ser considerada. Vowles (1954) mostrou que o órgão de Johnston é capaz de perceber gravidade e campos magnéticos que funcionam como um estímulo para orientação em formigas *M. ruginodis* e *M. laevinodis*.

Óxidos de ferro, (alumo)silicatos e partículas de Ti/O também foram encontrados em cortes ultrafinos de seções transversais da junção entre o pedicelo (P) e o escapo (S) (inserção da Figura IV.5.2a)

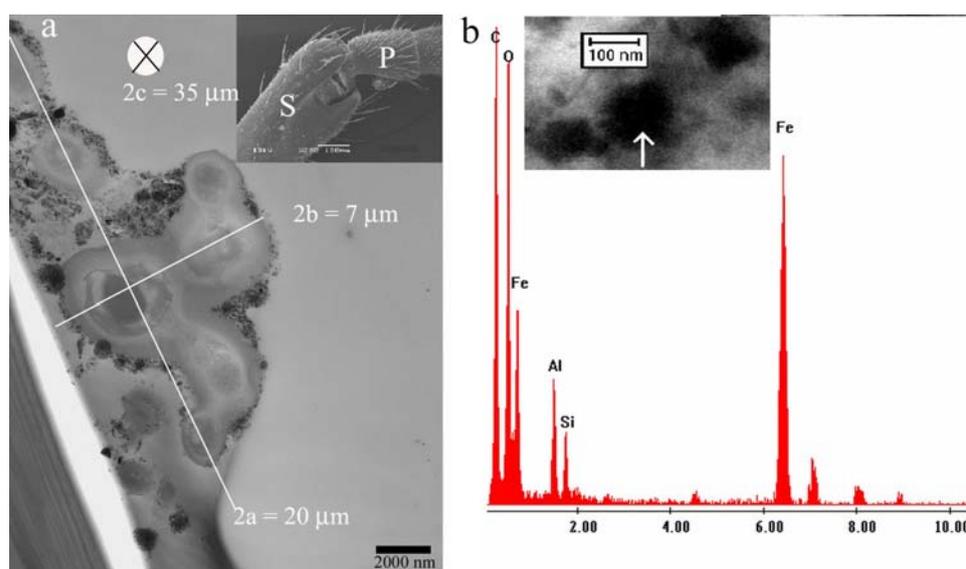


Figura IV.5.2: (a) Imagens obtidas por MET de cortes transversais ultrafinos da junção entre o pedicelo e o escapo mostrando parte de uma estrutura com partículas circundando-a. Os eixos do elipsóide são mostrados. Inserção: imagem de MEV mostrando a região da junção onde as partículas foram encontradas, parte do escapo (S) e pedicelo (P). (b) EDS das partículas da inserção (região similar de outra grade) mostrando uma grande quantidade de ferro. Inserção: seta aponta para uma partícula identificada como magnetita/maghemita pelo seu padrão de difração de elétrons. $d = 0,37, 0,264$ nm.

Partículas circundando uma estrutura cuja função é desconhecida foram observadas em cortes contínuos por uma extensão de 35 μm , portanto não pode ser considerada um artefato. A contrastação obtida sugere que a estrutura é rica em lipídios. A imagem 3D desta estrutura pode ser associada a um elipsóide com um semi-eixo a que varia de 7,5 a 12,5 μm e um semi-eixo b que varia de 3 a 4 μm (Figura IV.5.2a). EDS e difração de elétrons de área selecionada foram obtidos e permitiram a identificação de cristais de hematita, goetita e magnetita/maghemita. A seta na inserção da Figura IV.5.2b indica um cristal de magnetita/maghemita.

Devido à sua localização, supôs-se que esta estrutura é um proprioceptor. A função desconhecida desta estrutura motivou a utilização do modelo de ferromembrana (Winklhofer, 1999) para testá-la como possível magnetosensor do campo geomagnético. Já que esta estrutura composta de partículas é alongada, o comportamento magnético é anisotrópico e logo, um torque irá surgir se a ferromembrana é magnetizada em um ângulo oblíquo em relação ao eixo maior da estrutura de partículas. A sensibilidade magnética desta estrutura depende da susceptibilidade magnética, que por sua vez depende do tamanho, da concentração e dos parâmetros intrínsecos das partículas magnéticas. Como uma consequência desta anisotropia magnética, um torque irá surgir se a estrutura está magnetizada em um ângulo oblíquo em relação ao eixo maior. O torque tenta girar a estrutura de forma que esta se alinhe com o campo magnético externo, mas a rotação mecânica não é necessária para o processo de magnetorecepção. A detecção do torque magnético pode ser similar ao proposto como detector nulo de magnetita (Edmonds 1992), que considerou a resultante do torque em células de pelos hipotéticos contendo ou não magnetita. A diferença entre estes dois torques, isolaria a componente do torque magnético.

A sensibilidade magnética desta estrutura em um campo magnético pode ser estimada, supondo a susceptibilidade magnética intrínseca k , que depende do tamanho e da concentração das partículas magnéticas. Partículas de hematita SPM fracamente magnética comparada com magnetita, tais como as observadas na Figura IV.2.2a, possuem susceptibilidades que chegam a 0,01 G/Oe (Bodker *et al.* 1994, Raming *et al.* 2002). Para susceptibilidades maiores que 0,03 G/Oe e uma espessura de partículas magnéticas maior que 2,5 μm (região acima da estrutura de células, veja Figura IV.5.1a), o torque é suficiente para balancear a energia térmica a temperatura ambiente (Figura IV.5.3). Este

cálculo dá um limite inferior para a estimativa do torque, se considerarmos a presença de uma pequena quantidade de óxidos de ferro, em torno de 5%, incorporados com magnetita ou maguemita, o torque seria significativamente amplificado.

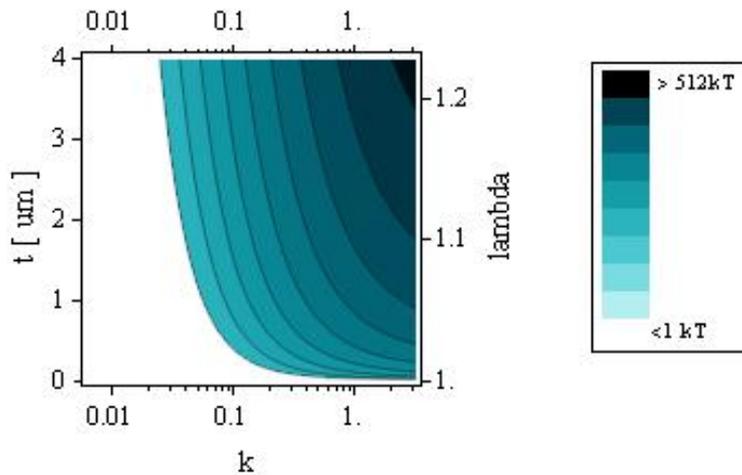


Figura IV.5.3: Torque magnético atuando na estrutura proprioceptora encontrada na junção entre escapo e pedicelo, em unidades de energia térmica, como função da susceptibilidade magnética, k , e da espessura da camada de partículas, t , para campo magnético local de 0,3 Oe. A estrutura do tipo célula é considerada como um elipsóide com eixos ($2c = 35 \mu\text{m}$, $2a = 2b = 7 \mu\text{m}$).

De acordo com o modelo teórico desenvolvido uma pequena quantidade de, por exemplo, hematita incorporada seria sensível o suficiente na detecção do campo geomagnético. Este modelo não considera a presença de compostos ferromagnéticos fortes, como magnetita e maghemita. A presença de partículas magnéticas, provavelmente incorporadas durante o processo de crescimento, encontradas dentro do tecido próximas a estruturas mecanosensoras em áreas muito específicas ao longo das partes da antena, sugere uma possível função magnetoreceptora.

As áreas contendo ferro observadas por microscopia ótica na junção entre a cabeça e o escapo em duas amostras (capítulo III, item 3) foram analisadas por MET, a partir de outra amostra, usando EDS e difração. Os dados de EDS das partículas desta área indicaram a presença de silicatos/alumosilicatos, Fe/O e Fe/Ti/O (**Figura IV.5.4d**). Imagens

de campo claro destas regiões revelaram uma grande quantidade de partículas pequenas (5-20 nm) circundando partículas grandes (de 500 nm a 2 μm) de Ti/Fe/O (Figura IV.5.4a) ou Fe/O (Figura IV.5.4c). A Figura IV.5.4d mostra o padrão de difração da partícula mostrada pela seta branca na Figura IV.5.4a. Os espaçamentos de 0,257, 0,272, 0,277 nm obtidos dos padrões de difração e as proporções de Ti:Fe:O de 1:1:3 em (a) encontradas a partir da análise quantitativa por EDS identificam esta partícula da Figura IV.5.4a como ilmenita. Outras proporções de Fe:Ti:O e Fe:O também foram encontradas em outras partículas sugerindo que outros compostos, além de ilmenita estão presentes.

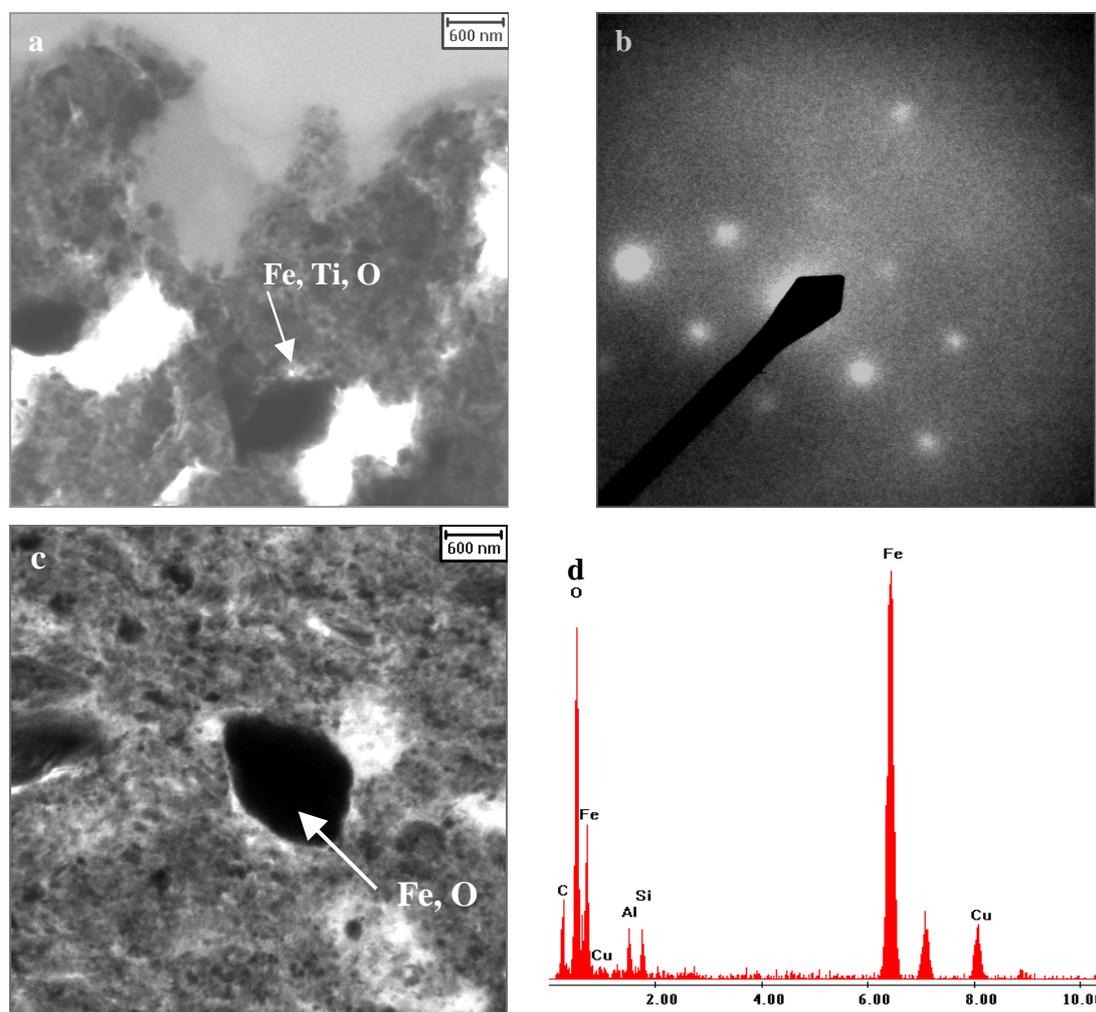


Figura IV.5.4: Imagens obtidas por MET de partículas na junção entre escapo e cabeça. (a) dois cristais grandes formados por Fe, Ti e O e o padrão de difração da partícula (seta branca) (b). (c) cristal grande de Fe e O. (d) EDS da partícula apontada em (c).

Uma comparação entre as frações de Fe, O, Al, Si e Ti obtidas da análise quantitativa por EDS nas partículas de amostras de solo e de cortes ultrafinos das 3 junções da antena estudadas são mostradas na **tabela II.5.1**.

Porcentagem atômica (%)						
Amostra (magn.)	O	Al	Si	Fe	Ti	Outros elementos
Solo (6,8 kx)	45,5	7,3	6,3	4,8	-	36
Solo a (25 kx)	44,5	6,3	6,2	8,1	-	34,9
Solo b (25 kx)	30	4,9	4,1	7,1	-	53,9
J E/P 1 (8,5 kx)	12,5	0,7	0,8	0,4	-	85,7
J E/P 2 (25 kx)	15,5	1,3	1,3	0,9	-	81
J E/P 1 (25 kx)	21,9	3,4	3	1,9	-	69,8
J E/P 1a (25 kx)	20,5	2,9	2,6	1,6	-	72,3
J C/E 1(2,5x)	38,3	6,1	4,8	2,9	-	47,9
J C/E 1 (25kx)	43,3	7,3	5,4	5,3	-	38,7
J C/E 1a (25kx)	45,7	8,6	6,6	3,6	-	35,5
J C/E 2 (1,7kx)	35,7	4,4	4	2,3	-	51
J C/E 2 (25 kx)	43,7	6,7	5,6	3,2	-	40,7
J C/E 2a (1,7 kx)	36,9	3,7	3,4	5,4	3,9	46,7
J C/E 2a (25 kx)	45,5	7,3	5,9	3,3	-	38
J C/E 2b(1,7 kx)	31,8	3,9	3,1	1,7	-	59,5
J C/E 2b (25 kx)	42,7	7	5,7	2,8	-	41,8
J C/E 2c (1,7 kx)	20	1,7	1,8	0,8	0,1	75,6
J C/E 2c (25 kx)	43,7	7,4	5,5	3,7	-	39,3
J C/E 2d(1,7 kx)	31,9	3,5	3,6	2,7	-	58,3
J C/E 2d (25 kx)	42,7	5,5	4,9	5,5	-	41,4
Botão (25kx)	20,5	2,9	2,7	2,3	-	71,7

Tabela II.5.1: Comparação de porcentagens atômicas obtidas por EDS em partículas do solo e das junções: entre o escapo e pedicelo (J E/P), cabeça e escapo (J C/E) e num botão quitinoso entre o pedicelo e 3º segmento. Entre parênteses estão os aumentos utilizados para cada medida. Na coluna outros elementos incluem-se C, Cu, Na, K e Os.

No geral as quantidades de Al, Si e Fe encontradas tanto no solo quanto nas amostras são proporcionais.

C, Cu, Na, K e Os são os elementos considerados na coluna “outros” da tabela. C é constituinte do filme de formvar da grade de microscopia e Cu é o material da grade. Na, K e Os foram encontrados em quantidades (< 1%). Estes elementos podem estar presentes

na própria amostra ou são contaminantes que não foram completamente removidos durante o processo de preparação. C possui a maior porcentagem entre os elementos da coluna “outros elementos”, variando de 30 a 86 %.

Os resultados encontrados sugerem que as formigas podem não biomineralizar partículas magnéticas, mas poderiam incorporá-las do solo. A distribuição do tamanho de grãos nas 3 junções da antena é larga e a composição mineralógica varia.

Embora as estruturas identificadas sejam diferentes dos candidatos magnetoreceptores em pombos, trutas ou bactérias magnéticas, ainda podem ser eficientes. Interessante notar que existem também diferenças entre os diferentes organismos. Interessante notar que existem também diferenças entre pombos e trutas no que se refere à estrutura dos possíveis magnetoreceptores. As partículas de magnetita no nariz da truta são magneticamente similares àquelas encontradas em bactérias magnéticas, enquanto as partículas de magnetita da parte superior do bico do pombo são muito menores, (3- 5nm) e formam aglomeradas (em grãos de diâmetro de 1 μm).

Capítulo V

Considerações finais

Medidas magnéticas (Acosta-Avalos *et al.* 1999, Wajnberg *et al.* 2000, Wajnberg *et al.* 2004) sugeriram a presença de magnetita biogênica nas partes do corpo, especialmente antenas, de formigas *Pachycondyla marginata*. Neste trabalho, MET foi utilizada pela primeira vez para localizar e caracterizar regiões com partículas que contêm ferro dentro do tecido antenal.

Diversos métodos e critérios baseados nos dados obtidos a partir de bactérias magnetotáticas em cultura, mutantes ou selvagens, têm sido desenvolvidos para distinguir cristais de magnetita biogênicos de inorgânicos (Guyodo *et al.* 2006, Kopp & Kirschvink 2008). Os cristais de magnetita (magnetossomos), sintetizados intracelularmente nas bactérias magnéticas, possuem características únicas em termos de tamanho da ordem de monodomínio, morfologia cubo-hexagonal e mineralogia. Métodos de identificação de magnetofósseis em solos envolvem a utilização de várias técnicas, entre elas magnetometria, MET, MEV e medidas de ressonância ferromagnética de forma a determinar características e propriedades magnéticas que diferenciariam ambos os tipos de cristais (Kopp *et al.* 2006). Todos estes critérios estão baseados nas características encontradas em magnetossomas bacterianos. Com o crescente interesse na magnetorecepção em outros organismos, a localização de partículas magnéticas como sensores ganhou importância, sendo a busca inicialmente dirigida para sistemas semelhantes ao das bactérias. No entanto, é importante mencionar que as características cristalinas não são necessariamente às das bactérias, já que o mecanismo envolvido, a magnetorecepção, é mais complexo do que o mecanismo passivo observado para bactérias quando sob ação de um campo magnético. Em pombos, por exemplo, arranjos de magnetita superparamagnética (SPM) foram encontrados na parte superior do bico destes animais (Hanzlik *et al.* 2000, Fleissner *et al.* 2003). Portanto, o problema da determinação da biogenicidade para cristais de magnetita em animais ainda não foi resolvido (Fortin & Langley 2005).

Minerais de ferro de origem externa (do solo e até do ar) podem aderir à cutícula e/ou podem ser ingeridos e encontrados no tórax e abdômen. Medidas de RPE de formigas *Pachycondyla marginata* mostrou uma redução da presença de contaminantes na superfície

destes insetos. Para obter-se uma amostra parcialmente livre de contaminantes superficiais e, apropriada para distintas medições, deve-se utilizar somente amostras que sejam recolhidas ainda vivas do ninho. Estas amostras devem ser armazenadas em recipientes livre de solo e 2 a 3 lavagens em etanol 70% + US devem ser feitas.

A distribuição dos dados obtidos a partir de medidas individuais indicou uma distribuição estreita de S e Hr e, uma distribuição larga de ΔH_{pp} .

As eqs I.3.8 e I.3.9 foram utilizadas para ajustar as curvas de Hr e ΔH_{pp} e estimar os diâmetros e as constantes de anisotropia destas amostras. Diâmetros magnéticos médios de $15,9 \pm 0,3$ nm, $14,3 \pm 0,4$ nm e $14,8 \pm 0,3$ nm e K_{efe} de $(7,5 \pm 0,5) \cdot 10^4$, $(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$ e $(8,9 \pm 0,8) \cdot 10^4$ erg/cm³ foram obtidos para as partículas dos extratos de cabeça, abdômen e tórax, respectivamente. Veja na **Tabela IV.1.4** K_{efe} e os diâmetros obtidos para todas as amostras medidas.

amostras	T (K)	K_{efe} (300K)	D (nm)
T3 - 1	70-290	$(6,6 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$9,2 \pm 0,2$
T4	7-290	$(8,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$15,4 \pm 0,1$
escapos	140-220	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$14,5 \pm 0,6$
flagelos	60-260	$(9,3 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$14,8 \pm 0,2$
Extratos	-	-	-
Antenas	210-300	$(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$11,4 \pm 0,4$
Cabeças	5-240	$(7,5 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$15,9 \pm 0,3$
Tórax	130-260	$(8,9 \pm 0,8) \cdot 10^4$	$14,8 \pm 0,3$
Abdomen	60-210	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$14,3 \pm 0,4$

Tabela IV.1.4: estimativas de diâmetros e as constantes de anisotropia das partes de formigas obtidas a partir dos modelos de (Morais *et al.* 2005, Morais *et al.* 1987) para Hr e ΔH_{pp} .

Os diâmetros estimados para as extratos magnéticos de cabeça, tórax, abdômen e T4 são aproximadamente os mesmos, enquanto o valor encontrado para antenas aproxima-se daquele da componente CA1 de T3. A partir dos dados de RFM não é possível diferenciar

os resultados de solo com as amostras. O aumento no valor de K_{efe} para os extratos provavelmente se deve ao uso do NaOCl. Os modelos utilizados pressupõem a existência de partículas superparamagnéticas, mas não consideram a presença de uma distribuição de tamanhos de partículas nem a mistura de materiais magnéticos.

Nos extratos magnéticos da cabeça, antena, tórax e abdômen destas formigas partículas contendo Fe/O puro e Al/SiO₂, em maior quantidade, foram encontradas. Além da composição, estas partículas possuem distintas formas e tamanhos, resultados distintos dos encontrados por RFM, devido às próprias restrições dos modelos utilizados e a suposição de que no sistema estudado só havia magnetita, desprezando-se então a contribuição de outros constituintes magnéticos. Magnetita não foi identificada nos extratos, mas mesmo que tivesse sido encontrada a atribuição biogênica não seria possível, já que a observação destas partículas nos tecidos é condição necessária, embora não suficiente, para esta atribuição. Portanto, se as partículas estão envolvidas em uma função fisiológica elas devem estar localizadas dentro de um tecido, provavelmente próximas à estruturas nervosas. A reação PB/TB utilizando o microscópio óptico é um método rápido para localizar regiões que contém ferro dentro do tecido. Cristais de Fe/O foram identificados por MET em três junções da antena, mas nenhuma região azul esteve visível nas regiões correspondentes, exceto na junção entre a cabeça e o escapo, quando observados por microscopia óptica.

Fe/O puros (ou óxidos de ferro) foram detectados em diferentes partes da antena da formiga *Pachycondyla marginata*: junção do 3^o segmento/pedicelo, pedicelo/escapo e cabeça/escapo. Estas três junções principais são ricas em estruturas sensoriais comuns aos indivíduos da classe Insecta e abrem uma nova perspectiva em relação à função de óxidos de ferro incorporados como possíveis sensores de campo magnético.

Na superfície cuticular do escapo e pedicelo, existem dois tipos de mecanorreceptores: sensila campaniforme e chaeticum. O primeiro responde a deformações na cutícula (Ehmer & Gronenberg 1997a) enquanto o segundo possui funções táteis e gustativas (Zacharuk 1980). Além disso, nas duas junções, pedicelo/escapo e escapo/cabeça, grupos de placas de pelos e também sensilas campaniforme foram observadas. As placas de pelo são compostas de pelos de Boehm, que é um proprioceptor, capaz de perceber mudanças na posição antenal (Sane *et al.* 2007).

O órgão de Johnston, que está localizado no pedicelo, funciona como um órgão mecanosensor percebendo alterações do flagelo em relação ao pedicelo. Por esta razão, ele deve atuar como órgão gravireceptor, auditivo, além de auxiliar no controle do voo (Sandeman 1976). Este órgão é composto de unidades sensoriais chamados escolopídeos, que estão simetricamente distribuídos dentro do pedicelo. Diferentes funções são atribuídas a este órgão e, se os óxidos de ferro presentes nos botões quitinosos estão ligados ao receptor, uma função magnetoreceptora também é possível. Kamikouchi et al. (2009) mostraram que o órgão de Johnston em moscas *Drosophila* (ordem Diptera) são responsáveis por gravirecepção, mas até o momento se supunha que estatólitos não estavam presentes (Eatock 2009). Os resultados aqui apresentados mostram que o órgão de Johnston em uma espécie de formiga (ordem Hymenoptera) possui partículas minerais densas incorporadas, que também poderiam servir como estatólitos para gravirecepção. A distribuição inhomogênea de partículas entre os botões quitinosos provavelmente é causada pelo desconhecimento da distribuição das mesmas por toda a estrutura. Estudos recentes mostraram que alguns aglomerados de neurônios no órgão de Johnston nas moscas de fruta respondem preferencialmente a gravidade/vento, enquanto outros preferencialmente ao som (Kamikouchi et al. 2009, Yorozu et al. 2009). Se as funções no órgão de Johnston são compartimentalizadas, é razoável que a presença de partículas magnéticas associada a magnetorecepção também esteja restrita a alguns botões quitinosos. Vowles (1954) mostrou que o órgão de Johnston é capaz de perceber gravidade e campos magnéticos, que funcionam como estímulos para orientação nas formigas *M ruginodis* e *M laevinodis*.

Na junção do escapo e pedicelo, uma estrutura do tipo celular circundada por diferentes tipos de partículas com e sem ferro, cuja função é desconhecida, foi encontrada (Figura IV.5.1a). Assumiu-se que toda a estrutura é um proprioceptor, devido à sua localização especial. A estrutura alongada implica em um comportamento magnético anisotrópico (Figura IV.5.1a). O modelo de ferromembranas (Winklhofer, 1999) dá um limite inferior para o torque magnético atuando nesta estrutura, para uma pequena quantidade de óxidos de ferro.

Em formigas, o escapo está conectado a cabeça através de uma junção monocondílica. Ela pode ser movida por quatro músculos extrínsecos que estão localizados dentro da cápsula da cabeça. Isso dá ao escapo, e logo a toda antena, uma grande liberdade

de movimentos. O segundo segmento antenal, o pedicelo, está conectado ao escapo por uma junção do tipo dobradiça e só pode ser movido no plano por um par de músculos confinados dentro do escapo e chamados de músculos antenais intrínsecos. Todos estes músculos controlam os movimentos antenais (Ehmer & Gronenberg 1997a, Ehmer & Gronenberg 1997b). Dentro da cápsula da cabeça encontra-se o órgão de Janet. Escolopófaros e dendritos, que compõem este órgão, formam um conjunto elástico que é distendido pelo movimento antenal. A parte final do escolopóforo insere-se dentro de processo internos na base do escapo (Ehmer & Gronenberg 1997a, Ehmer & Gronenberg 1997b). As partículas contendo ferro, encontradas dentro da junção monocondílica e regiões circunvizinhas, sugerem que esta parte pode estar envolvida, junto com as outras estruturas já mencionadas, na detecção do campo magnético terrestre.

A quantidade de material magnético não deve ser importante quando se considera um sistema magnetoreceptor. Mais importante é que a quantidade de material existente esteja relacionada a uma determinada estrutura sensorial para transdução e propagação da resposta magnética. Regiões como tórax e abdômen são ricas em material ingerido, enquanto as pernas estão em contato direto com o solo que pode ser mais facilmente removido do que sujeiras em outras partes.

(Okada & Toh 2001) sugeriram que a detecção da posição de um objeto pode ser calculada centralmente quando os sinais de saída táteis do flagelo e dos mecanorreceptores no escapo e pedicelo são combinados no sistema nervoso central. De maneira semelhante, os sinais relacionados à percepção de gravidade e/ou campos magnéticos pelos diferentes proprioceptores e mecanorreceptores presentes nas junções da antena estudadas e sensilas também podem se combinar gerando um sinal de saída que é fonte de informação para a orientação gravitaiconal e/ou magnética destas formigas. No entanto, a forma pela qual os órgãos sensores detectam o sinal devido o efeito do campo magnético sobre as partículas não está clara. O sistema de detecção proposto por (Edmonds 1992), ou o amplificador de campos magnéticos (Schiff 1991) ou a rotação de cristais de magnetita monodomínios atuando diretamente em estruturas nervosas (Schiff 1991), parecem adequados, mas nenhum destes modelos foram verificados experimentalmente. De qualquer maneira, a presença de partículas magnéticas, provavelmente incorporadas durante o processo de crescimento, encontradas dentro do tecido próximo a estruturas mecanosensoras, em áreas

muito específicas ao longo da antena de formigas *P. Marginata*, sugerem este órgão como um possível magnetoreceptor.

Referências

Abe, K., Miyamoto, Y. & Chikazumi, S. 1976 Magnetocrystalline Anisotropy of Low Temperature Phase of Magnetite. *J. Phys. Soc. Japan* **41** 1894-1902. (doi:10.1143/JPSJ.41.1894).

Abraçado, L. G., Esquivel, D. M. S., Alves, O. C. & Wajnberg, E. Magnetic material in head, thorax and abdomen of *Solenopsis substituta* ants: a ferromagnetic resonance (FMR) study. *J. Magn. Res.* **175** 309-316, 2005. (doi: 10.1016/j.jmr.2005.05.006)

Abraçado, L. G., Esquivel, D. M. S. & Wajnberg, E. 2008 Oriented magnetic material in head and antennae of *Solenopsis interrupta* ant. *JMMM* **320** e204 - e206. (doi:10.1016/j.jmmm.2008.02.048).

Abraçado, L. G., Esquivel, D. M. S. & Wajnberg, E. 2009 Solenopsis ant magnetic material: statistical and seasonal studies. *Phys. Biol.* **6** 046012 - 046022 (doi:10.1088/1478-3975/6/4/046012).

Acosta-Avalos, D., Esquivel, D. M. S., Wajnberg, E., Lins de Barros, H. G. P., Oliveira, P. S. & Leal, I. 2001 Seasonal patterns in the orientation system of the migratory ant *Pachycondyla marginata*. *Naturwissenschaften* **88** 343 - 346. (DOI 10.1007/s001140100245).

Acosta-Avalos, D., Wajnberg, E., Oliveira, P. S., Leal, I., Farina, M. & Esquivel, D. M. S. 1999 Isolation of magnetic nanoparticles from *Pachycondyla marginata* ants. *J. Exp. Biol.* **202** 2687-2692.

Aguiar, G. D. & Espíndola, C. R. 1995 Caracterização dos solos da Mata de Santa Genebra, Campinas, SP. Relatório de Estágio, Faculdade de Engenharia Agrícola UNICAMP 1-32.

Altner, H. & Loftus, R. 1985 Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Ann. Rev. Entomol.* **30** 273 - 295.

Altner, H. & Prillinger, L. 1980 Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo- and hygroreceptors and their functional significance. *Int. Rev. Cytol.* **67** 69 - 139.

Alves, O. C., Wajnberg, E., Oliveira, J. F. d. & Esquivel, D. M. S. 2004 Magnetic material arrangement in oriented termites: a magnetic resonance study. *J. Magn. Res.* **168** 246 - 251. (10.1016/j.jmr.2004.03.010).

INSERIR AMCSD WEBSITE no texto <http://ruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>

Andel, D. & Wehner, R. 2004 Path integration in desert ants, *Cataglyphis*: how to make a homing ant run away from home. *Proc. R. Soc. Lond. B* **271** 1485 - 1489. (doi: 10.1098/rspb.2004.2749.).

Anderson, J. B. & Vander Meer, R. K. 1993 Magnetic orientation in fire ant, *Solenopsis invicta*. *Naturwissenschaften* **80** 568-570.

- Angel, B. R.** & Vincent, W. E. J. 1978 Electron spin resonance studies of iron oxides associated with the surface of Kaolinite. . *Clays Clay Miner.* **26** 263 - 272.
- Banks, A. N.** & Srygley, R. B. 2003 Orientation by magnetic field in leaf-cutter ants, *Atta colombica* (Hymenoptera: Formicidae). *Ethology* **109** 835 - 846
- Bell, W. J.** 1991 *Searching Behaviour: The Behavioural Ecology of Finding Resources*. London: Chapman & Hall.
- Belov, K. P.** 1993 Electronic processes in magnetite (or, "Enigmas of magnetite"). *Phys. - Uspekhi* **36** 380 - 391. (doi: 10.1070/PU1993v036n05ABEH002160).
- Bickford, L. R.** 1950 Ferromagnetic resonance absorption in magnetite single crystals. *Phys. Rev.* **78** 449 - 457. (doi: 10.1103/PhysRev.78.449).
- Blakemore, R. P.** 1975 Magnetotactic bacteria. . *Science* **190** 377 - 379.
- Bodker, F.,** Morup, S. & Linderoth, S. 1994 Surface effects in metallic iron nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **72** 282 - 285. (doi: 10.1103/PhysRevLett.72.282).
- Bozzola, J. J.** & Russel, L. D. 1999 *Electron Microscopy: principles and techniques for biologists,*
- Çamlitepe, Y.,** Aksoy, V., Neslihan, Uren, Ayse, Yilmaz & Becenen, I. 2005 An experimental analysis on the magnetic field sensitivity of the black-meadow ant *Formica pratensis* Retzius (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Biologica Hungarica* **56**
- Çamlitepe, Y.** & Stradling, D. J. 1995 Wood Ants Orient to Magnetic Fields. *Proceedings Royal Society of London B* **261** 37- 41. (doi: 10.1098/rspb.1995.0114).
- Cassill, D. L.** & Tschinkel, W. R. 1999 Task selection by workers of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **45** 301 - 310.
- Cator, L. J.,** Arthur, B. J., Harrington, L. C. & Hoy, R. R. 2009 Harmonic Convergence in the Love Songs of the Dengue Vector Mosquito. *Science* **323** 1077 - 1079. (DOI: 10.1126/science.1166541).
- Chapman, R. F.** 1998 *The insects: structure and function*, Cambridge: Cambridge University Press
- Chambarelli, L. L.,** Pinho, M. A., Abraçado, L. G., Esquivel, D. M. S. & Wajnberg, E. 2008 Temporal and preparation effects in the magnetic nanoparticles of *Apis mellifera* body parts. *JMMM* **320** e207 - e210. (doi:10.1016/j.jmmm.2008.02.049).
- Collet, M.** & Collet, T. S. 2000 How do insects use path integration for their navigation? *Biol. Cyber.* **83** 245 - 259.

Colombo, U., Fagherazzi, G., Gazzarrini, F., Lanzavecchia, G. & Sironi, G. 1964 Mechanisms in the First Stage of Oxidation of Magnetites. *Nature* 175 - 176. (doi:10.1038/202175a0).

Cruz-Landim, C. & Mello, R. A. 1981 Desenvolvimento e envelhecimento de larvas e adultos de *Scaptotrigona postica* latreille (Hymenoptera: Apidae): aspectos histológicos e histoquímicos. *Academia de Ciências do Estado de São Paulo* **31**

Davila, A. F., Fleissner, G., Winklhofer, M. & Petersen, N. 2003 A new model for a magnetoreceptor in homing pigeons based on interacting clusters of superparamagnetic magnetite. *Phys. Chem. Earth* **28** 647–652 (DOI: 10.1016/S1474-7065(03)00118-9).

Davila, A. F., Winklhofer, M., Shcherbakov, V. P. & Petersen, N. 2005 Magnetic pulse affects a putative magnetoreceptor mechanism. *Biophys. J.* **89** 56-63 (doi: 10.1529/biophysj.104.049346).

Dickinson, M. H. 1999 Haltere-mediated equilibrium reflexes of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. . *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354** 903 -916.

Diebel, C. E., Proksch, R., Green, C. R., Nellson, P. & Walker, M. M. 2000 Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor. *Nature* **406** 299-302 (doi:10.1038/35018561).

Dumpert, K. 1972a Bau und Verteilung der Sensillen auf der Antennengeißel von *Lasius fuliginosus* (Latr.) (Hymenoptera, Formicidae). *Z. Morphol. Tiere* **73** 95 - 116.

Dumpert, K. 1972b Alarmstoffrezeptoren auf der Antenne von *Lasius fuliginosus* (Latr.) (Hymenoptera, Formicidae). *Z. vergl. Physiol.* **76** 403 - 425.

Dunlop, D. & Özdemir, Ö. 1997 *Rock magnetism - fundamentals and frontiers.*, Cambridge:

Eatock, R. A. 2009 Up, down, flying around. *Nature* **458** 156 - 157. (doi:10.1038/458156a).

Eberl, D. F., Hardy, R. W. & Kernan, M. J. 2000 Genetically Similar Transduction Mechanisms for Touch and Hearing in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **20** 5981 – 5988.

Ehmer, B. & Gronenberg, W. 1997a Proprioceptors and fast antennal reflexes in the ant *Odontomachus* (Formicidae, Ponerinae). *Cell Tissue Research* **290** 153 - 165. (doi: 10.1007/s004410050917).

Ehmer, B. & Gronenberg, W. 1997b Antennal muscles and fast antennal movements in ants. *J. Comp. Physiol. B* **167** 287 - 296. (doi: 10.1007/s003600050076).

Edmonds, D. T. 1992 A Magnetite Null Detector as the Migrating Bird's Compass *Proc. Biol. Sci.* **249** 27 - 31. (10.1098/rspb.1992.0079).

Esquivel, D. M. S., Acosta-Avalos, D., El-Jaick, L. J., Cunha, A. D. M., Malheiros, M. G., Wajnberg, E. & Linhares, M. P. 1999 Evidence for magnetic material in the fire ant

Solenopsis sp. by Electron Paramagnetic Resonance measurements. *Naturwissenschaften* **86** 30 - 32. (doi: 10.1007/s001140050564).

Esquivel, D. M. S., Wajnberg, E., Linhares, M. P., Acosta-Avalos, D. & El-Jaick, L. J. 2001 EPR study of Honeybees *Apis mellifera* abdomens. *Eur. Biophys. J.* **29** 579 - 586. (doi: 101007/s002490000115).

Esquivel, D. M. S., Wajnberg, E., Nascimento, F. S. d., Pinho, M. B., Lins de Barros, H. G. P. & Eizemberg, R. 2007 Do geomagnetic storms change the behaviour of the stingless bee guirucu (*Schwarziana quadripunctata*)? *Naturwissenschaften* **94** 139 - 142. (DOI: 10.1007/s00114-006-0169-z).

Field, L. H. & Matheson, T. 1998 Chordotonal Organs of Insects. *Adv. Insect Physiol.* **27** 1 - 230.

Fischer, H., Luster, J. & Gehring, A. U. 2007 EPR evidence for maghemitization of magnetite in a tropical soil. *Geophys. J. Int.* **169** 909 - 916. (doi:10.1111/j.1365-246X.2007.03311.x).

Fleissner, G., Holtkamp-Rotzler, E., Hanzlik, M., Winklhofer, M., Fleissner, G., Petersen, N. & Wiltshko, W. 2003 Ultrastructural Analysis of a Putative Magnetoreceptor in the Beak of Homing Pigeons. *J Comp Neurol.* **458** 350-360 (doi: 10.1002/cne.10579).

Fortin, D. & Langley, S. 2005 Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals. *Earth Sci. Reviews* **72** 1 - 19 (doi:10.1016/j.earscirev.2005.03.002).

Frisch, K. v. 1967 *The dance language and orientation of bees.*, Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

Fukushi, T. 2001 Homing in wood ants, *Formica japonica*. . *J. Exp. Biol.* **204** 2063 - 2072.

Fukushi, T. & Wehner, R. 2004 Navigation in wood ants, *Formica japonica*: context dependent use of landmarks. . *J. Exp. Biol.* **207** 3431 - 3439.

Gallagher, K. J., Feitknecht, W. & Mannweiler, U. 1968 Mechanism of Oxidation of Magnetite to γ -Fe₂O₃. *Nature* **217** 1118 - 1121. (doi:10.1038/2171118a0).

Garcia, J. & Subias, G. 2004 The Verwey transition – a new perspective. *J. Phys. Condens. Matter* **16** R145 - R178. (DOI: 10.1088/0953-8984/16/7/R01).

Gehring, A. U. & Karthein, R. 1990 An ESR and calorimetric study of iron oolitic samples from the Northampton Ironstone. *Clay Miner.* **25** 303 - 311.

Gonçalves, C. B. S. 2007 *Morfometria da antena, número e distribuição de estruturas sensoriais olfativas em abelhas euglossina e meliponina (Hym: Apidae)* UFGD Dourados

Göpfert, M. C. & Robert, D. 2002 The mechanical basis of *Drosophila* audition *J. Exp. Biol.* **205** 1199 -1208.

Gould, J. L. 2008 Animal navigation: the evolution of magnetic orientation. *Current Biology* **18** R482 - R484 (doi:10.1016/j.cub.2008.03.052).

Gould, J. L., Kirschvink, J. L. & Deffeyes, K. S. 1978 Bees have magnetic remanence. *Science* **201** 1026 - 1028. (DOI: 10.1126/science.201.4360.1026).

Griscom, D. L. 1974 Ferromagnetic resonance spectra of lunar fines: some implications of line shape analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* **38** 1509 - 1519. (doi: 10.1016/0016-7037(74)90171-9).

Griscom, D. L. 1980 Ferromagnetic resonance of fine grained precipitates in glass: a thumbnail review. *J. Non-Cryst. Solids* **42** 287 - 296. (doi: 10.1016/0022-3093(80)90030-7).

Guskos, N., Papadopoulos, G. J., Likodimos, V., Patapis, S., Yarmis, D., Przepiera, A., Przepiera, K., Majszczyk, J., Typek, J., Wabia, M., Aidinis, K. & Drazek, Z. 2002 Photoacoustic, EPR and electrical conductivity investigations of three synthetic mineral pigments: hematite, goethite and magnetite. *Mater. Res. Bull.* **37** 1051 - 1061. (doi:10.1016/S0025-5408(02)00742-0).

Guyodo, Y., LaPara, T. M., Anschutz, A. J., Lee Penn, R., Banerjee, S. K., Geiss, C. E. & Zanner, W. 2006 Rock magnetic, chemical and bacterial community analysis of a modern soil from Nebraska. *Earth Planet. Sci. Letters* **251** 1-2 (DOI: 10.1016/j.epsl.2006.09.005).

Haddad, A., Sesso, A., Attias, M., Farina, M., Meirelles, M. N., Silveira, M., Benchimol, M., Soares, M. J., Ortrud, M. B., Machado, R. D., Souto-Pradrón, T. & Souza, W. 1998 *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*.

Hall, D. H. 1995 *Electron Microscopy and Three-Dimensional Image Reconstruction*, New York: Academic Press

Hallberg, E. 1981 Johnston's Organ in *Neodiprion sertifer* (Insecta: Hymenoptera). *Journal of Morphology* **167** 305 - 312. (doi: 10.1002/jmor.1051670305).

Hallberg, E., Hansson, B. S. & Steinbrecht, R. A. 1994 Morphological characteristics of antennal sensilla in the European cornborer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Tissue cell* **26** 489 - 502.

Hallberg, E., Hansson, B. S. & Löfstedt, C. 1999 *Lepidoptera, moths and butterflies: Morphology, Physiology and Development* // Niels P. Kristensen (ed.). Berlin ; New York : W. de Gruyter, :

Hansson, B. S., Lofstedt, C., Lofqvist, J. & Hallberg, E. 1986 Spatial arrangement of different types of pheromone-sensitive sensilla in a male moth. *Naturwissenschaften* **73** 267 - 270. (doi: 10.1007/BF00367782).

Hanzlik, M., Heunemann, C., Holtkamp-Rötzler, E., Winklhofer, M., Petersen, N. & Fleissner, G. 2000 Superparamagnetic Magnetite in the Upper Beak Tissue of Homing Pigeons. *Biometals* **13** 325 - 331. (doi: 10.1023/A:1009214526685).

Hashimoto, Y. 1990 Unique Features of Sensilla on the Antennae of Formicidae (Hymenoptera). *Appl. Ent. Zool.* **25** 491 - 501.

Heinzel, H. G. & Gewecke, M. 1979 Directional sensitivity of the antennal campaniform sensilla in locusts. *Naturwissenschaften* **66** 212 - 213. (DOI: 10.1007/BF00366034).

Hölldobler, B. 1980 Canopy orientation: a new kind of orientation in ants. *Science* **210** 86 - 88. (DOI: 10.1126/science.210.4465.86).

Hsu, C. Y. 2004 The processes of iron deposition in the common hornet (*Vespa affinis*). *Biol. Cell* **96** 529 -537.

Hsu, C. Y., Ko, F. Y., Li, C. W., Fann, K. & Lue, J. T. 2007 Magnetoreception System in Honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* **2** e395 - e406 (doi: 10.1371/journal.pone.0000395).

Hsu, C. Y. & Li, C. W. 1993 The ultrastructure and formation of iron granules in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. exp. Biol.* **180**, 1-13 (1993 **180** 1 - 13).

Hsu, C. Y. & Li, C. W. 1994 Magnetoreception in Honeybees. *Science* **265** 95 - 97. (DOI: 10.1126/science.265.5168.95).

Hunt, C. P., Singer, M. J., Kletetschka, G., Ten Pas, J. & Verosub, K. L. 1995 Effect of citrate-bicarbonate-dithionite treatment on fine-grained magnetite and maghemite. *Earth planet. Sci. Lett.* **130** 87 - 94.

Isidoro, N., Bin, F., Colazza, S. & Vinson, S. B. 1996 Morphology of antennal gustatory sensilla and glands in some parasitoids Hymenoptera with hypothesis on their role in sex and host recognition. *J. Hym. Res.* **5** 206 - 239.

Isidoro, N., Bartlet, E., Ziesmann, J. & Williams, I. H. 1998 Antennal contact chemosensilla in *Psylliodes chrysocephala* responding to cruciferous allelochemicals. *Physiol. Entomol.* **23** 131 - 138.

Isidoro, N., Romani, R., Velasquez, D., Renthal, R., Bin, F. & Vinson, S. B. 2000 Antennal glands in queen and worker of the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren: first report in female social Aculeata (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes soc.* **47** 236 - 240.

Isidoro, N., Romani, R. & Bin, F. 2001 Antennal multiporous sensilla; their gustatory features for host recognition in female wasps (Insecta, Hymenoptera: Platygastroidea). *Microsc. Res. Tech.* 350 - 358.

Jaisson, P. 1969 Fitudes de la distribution des organes sensoriels de l'antenne et de leurs relations possible avec le comportement chez deux fourmis myrmicines. *Myrmica*

laeuinodis Nyl. et Aphaenogaster gibbosa Latr. recoltées dans la région des Eyzius. *Insectes Soc.* **16** 279 - 312.

Jander, R. & Jander, U. 1998 The light and the magnetic compass of the weaver ant, *Oecophylla smaragdina* (Hymenoptera: Formicidae). *Ethology* **104** 743 - 758.

Kamikouchi, A., Inagaki, H. K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Goepfert, M. C. & Ito, K. 2009 The neural basis of Drosophila gravity-sensing and hearing. *Nature* **458** 165 - 172. (doi:10.1038/nature07810).

Keil, T. A. 1997 Functional Morphology of Insect Mechanoreceptors. . *Microsc. Res. Tech.* **39** 506 - 531.

Keil, T. A. & Steinbrecht, R. A. 1984 *Mechanosensitive and olfactory sensilla of insects.*, New York: Plenum

Keim, C. N., Cruz-Landim, C., Carneiro, F. G. & Farina, M. 2002 Ferritin in iron containing granules from the fat body of the honeybees *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica*. *Micron* **33** 53 - 59.

Kirschvink, J. L. & Gould, J. L. 1981 Biogenic magnetite as a basis for magnetic detection in animals. *Biosystems* **13** 181 - 201.

Kirschvink, J. L. & Walker, M. M. 1995 Honeybees and Magnetoreception. *Science* **269** 1889 (DOI: 10.1126/science.269.5232.1889).

Kittel, C. 1948 On the theory of ferromagnetic resonance absorption. . *Phys. Rev.* **73** 155 -161. (doi: 10.1103/PhysRev.73.155).

Kleineidam, C. & Tautz, J. 1996 Carbon dioxide receptors in the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. *Proc 24th Göttingen Neurobiol Conference.* 260

Kopp, R. E., Nash, C. Z., Kobayashi, A., Weiss, B. P., Bazylinski, D. A. & Kirschvink, J. L. 2006 Ferromagnetic resonance spectroscopy for assessment of magnetic anisotropy and magnetostatic interactions: A case study of mutant magnetotactic bacteria. *J. Geophys. Res.* **111**, B12S25 (11 - 15) (doi:10.1029/2006JB004529).

Kopp, R. E. & Kirschvink, J. L. 2008 The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria. *Earth Sci. Reviews* **86** 42 - 61. (doi:10.1016/j.earscirev.2007.08.001).

Kramer, G. 1953 Wird die Sonnenhöhe bei der Heimfindeorientierung verwertet? *J. Ornith.* **94** 201 - 219. (10.1007/BF01922508).

Kuterbach, D. A. & Walcott, B. 1986 Iron-containing cells in the honey bee (*Apis mellifera*) *J. exp. Biol.* **126** 375 - 387.

Labhart, T. 1986 The electrophysiology of photoreceptors in different eye regions of the desert ant, *Cataglyphis bicolor*. . *J. Comp. Physiol. A* **158** 1 - 7

Labhart, T. & Meyer, E. P. 2002 Neural mechanisms in insect navigation: polarization compass and odometer. . *Curr. Opin Neurobiol.* **12** 707 - 714. (DOI: 10.1016/S0959-4388(02)00384-7).

Lohmann, K. J., Lohmann, C. M. F. & Endres, C. S. 2008 The sensory ecology of ocean navigation. *The Journal of Experimental Biology* **211** 1719 -1728. (doi: 10.1242/jeb.015792).

Lucano, M. J., Cernicchiaro, G., Wajnberg, E. & Esquivel, D. M. S. 2006 Stingless Bee Antennae: A Magnetic Sensory Organ? *Biometals* **19** 295 - 300. (doi: 10.1007/s10534-005-0520-4).

Maeda, K., Henbest, K. B., Cintolesi, F., Kuprov, I., Rodgers, C. T., Liddell, P. A., Gust, D., Timmel, C. R. & Hore, P. J. 2008 Chemical compass model of avian magnetoreception. *Nature* 387 - 391. (doi:10.1038/nature06834).

Maher, B. A. 1998 Magnetite biomineralization in termites. *Proc. R. Soc. Lond. B* **265** 733 -737. (doi: 10.1098/rspb.1998.0354.).

Mann, S., Sparks, N. H. C., Walker, M. M. & Kirschvink, J. L. 1988 Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *The Journal of Experimental Biology* **140** 35-49.

Martini, R. 1986 Fine structure and development of the large sensilla basiconica of the antennae of sphecid wasps. *Tissue cell* **18** 143 - 151.

Martini, R. & Schmidt, K. 1984 Ultrastructure and early development of the pore plate sensilla of *Gymnomerus laevipes* (Shugkard) (Vespoidea, Eumenidae). . *Protoplasma* **119** 197 - 211.

Masson, C. & Gabouriaut, D. 1973 Ultrastructure de l'organe de Johnston de la Fourmi *Camponotus vagus* Scop. (Hymenoptera, Formicidae). *Zeitschrift fuer Zellforschung und mikroskopische anatomie* **140** 39 -75. (doi: 10.1007/BF00307058).

McIndoo, N. E. 1922 The auditory sense of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* **34** 173 - 199.

Masson, C., D. Gabouriaut and A. Friggi 1972 Ultrastructure d'un nouveau type de recepteur olfactif de l'antenne d'insecte trouve chez la fourmi *Camponotus vagus* Scop. (Hymenoptera, Formicinae). *Z. Morphol. Tiere* **72** 349 - 360.

Masson, C. & Friggi, A. 1971 Fitude morphologique et topographique des sensilla ampullacea de l'antenne de l'ouvriere de *Camponotus vagus* Scop. (Hym. Formicidae). . *C. R. Acad. Sci. D* **272** 618 - 621.

McIndoo, N. E. 1922 The auditory sense of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* **34** 173 - 199.

- Mclver, S. B.** 1975 Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **20** 381 - 397. (doi:10.1146/annurev.en.20.010175.002121).
- Meads, R. E.** & Malden, P. J. 1975 Electron spin resonance in natural KAolinites containing Fe(III) and other transition metal ions. . *Clay Miner.* **10** 313 – 345.
- Merivee, E.**, Ploomi, A., Rahi, M., Bresciani, J., Ravn, H. P., Luik, A. & Sammelselg, V. 2002 Antennal sensilla of the ground beetle *Bembidion properans* Steph. (Coleoptera, Carabidae). *Micron* **33** 429 - 440. (doi:10.1016/S0968-4328(02)00003-3).
- Morais, P. C.**, Lara, M. C. F. L. & Skeff Neto, K. 1987 Electron spin resonance in superparamagnetic particles dispersed in a non-magnetic matrix. . *Philos. Mag. Lett.* **55** 181 - 183. (10.1080/09500838708207553).
- Morais, P. C.**, Lima, E. C. D., Rabelo, D., Reis, A. C. & Pelegrini, F. 2000 Magnetic Resonance of Magnetite Nanoparticles Dispersed in Mesoporous Copolymer Matrix. . *IEEE Trans. Mag.* **36** 3038 - 3040.
- Morais, P. C.**, Santos, J. G., Neto, K. S., Pelegrini, F. & De Cuyper, M. 2005 Magnetic resonance of magnetic fluid and magnetoliposome preparations. *JMMM* **293** 526 - 531. (doi: 10.1016/j.jmmm.2005.01.069).
- Moskowitz, B.** 1991 Hitchhiker's Guide to Magnetism. *Notes for the Environmental Magnetism Workshop at the Institute for Rock Magnetism*
- Murad, E.** & Schwertmann, U. 1993 Temporal stability of a fine-grained magnetite. *Clays Clay Miner.* **41** 111–113.
- Muxworthy, A. R.** & McClelland, E. 2000 Review of the low-temperature magnetic properties of magnetite from a rock magnetic perspective. *Geophys. J. Int.* **140** 101 - 114 (doi: 10.1046/j.1365-246x.2000.00999.x).
- Nesson, M. H.** 1995 Honeybees and Magnetoreception. *Science* **269** 1889 - 1890. (DOI: 10.1126/science.269.5232.1889-a).
- Nichol, H.** & Locke, M. 1995 Honeybees and Magnetoreception. *Science* **269** 1888 - 1889. (DOI: 10.1126/science.269.5232.1888).
- O'Leary, D. P.**, Vilches-Troya, J., Dunn, R. F. & Campos-Munoz, A. 1981 Magnets in guitarfish vestibular receptors. *Experientia* **37** 86 - 88. (doi: 10.1007/BF01965587).
- Okada, J.** & Toh, Y. 2000 The role of antennal hair plates in object guided tactile orientation of the cockroach (*Periplaneta americana*). . *J. Comp. Physiol. A* **186** 849 - 857.
- Okada, J.** & Toh, Y. 2001 Peripheral representation of antennal orientation by the scapal hair plate of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **204** 4301 - 4309.

Oliveira, J. F., Wajnberg, E., Esquivel, D. M. S., Weinkauff, S., Winklhofer, S. & Hanzlik, M. 2009 Ant antennae: Are they sites for magnetoreception? *J. Royal Soc. Interface*

Oliveira, J. F., Alves, O. C., Esquivel, D. M. S. & Wajnberg, E. 2008 Ingested and biomineralized magnetic material in the prey *Neocapritermes opacus* termite: FMR characterization. *J. Magn. Res.* **191** 112 -119. (doi: 10.1016/j.jmr.2007.12.006).

Oliveira, J. F., Wajnberg, E., Esquivel, D. M. S. & Alves, O. C. 2005 Magnetic resonance as a technique to magnetic biosensors characterization in *Neocapritermes opacus* termites. *JMMM* **294** e171 - e174. (doi:10.1016/j.jmmm.2005.03.078).

Oorschoot, I. H. M. V. & Dekkers, M. J. 1999 Dissolution behaviour of fine grained magnetite and maghemite in the citrate-bicarbonate-dithionite extraction method. *Earth planet. Sci. Lett.* **167** 283 - 295.

Raming, T. P., Winnubst, A. J. A., van Kats, C. M. & Philipse, A. P. 2002 The Synthesis and Magnetic Properties of Nanosized Hematite (α -Fe₂O₃) Particles. *J. Colloid Interface Sci.* **249** 346 – 350. (doi:10.1006/jcis.2001.8194).

Renthal, R., Velasquez, D., Olmosa, D., Hamptona, J. & Wergin, W. P. 2003 Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron* **34** 405 - 413. (doi:10.1016/S0968-4328(03)00050-7).

Ridley, M. 2003 *Evolution*, 3a Ed. Blackwell Pub. 560 pp.:

Ritz, T., Adem, S. & Schulten, K. 2000 A Model for Photoreceptor-Based Magnetoreception in Birds. *Biophysical Journal* **78** 707 - 718. (doi: 10.1016/S0006-3495(00)76629-X).

Ritz, T., Thalau, P., Phillips, J., Wiltschko, R. & Wiltschko, W. 2004 Resonance effects indicate a radical pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature* **429** 177 - 180. (doi:10.1038/nature02534).

Riveros, A. J. & Srygley, R. B. 2008 Do leafcutter ants, *Atta colombica*, orient their path-integrated home vector with a magnetic compass? *Animal behav.* **75** 1273 -1281. (doi: 10.1016/j.anbehav.2007.09.030).

Ronacher, B., Gallizzi, K., Wohlgemuth, S. & Wehner, R. 2001 Lateral optic flow does not influence distance estimation in the desert ant *Cataglyphis fortis*. *J. Exp. Biol.* **203** 1113 - 1121.

Rossel, S. & Wehner, R. 1986 Polarization vision in bees. *Nature* **323** 128 - 131. (doi: 10.1038/323128a0).

Sandeman, D. C. 1976 *Structure and function of proprioceptors in the invertebrates*, London: Chapman & Hall

Sane, S. P., Dieudonné, A., Willis, M. A. & Daniel, T. L. 2007 Antennal Mechanosensors Mediate Flight Control in Moths. *Science* **315** 863 - 866. (DOI: 10.1126/science.1133598).

Santschi, F. 1911 Observations et remarques critiques sur le mechanisme de l'orientation chez les fourmis. . *Revue Suisse Zool.* **19** 305 - 338.

Schiff, H. 1991 Modulation of spike frequencies by varying the ambient magnetic field and magnetite candidates in bees (*Apis mellifera*). *Comp. Biochem. Physiol.* pp. , 1991 **100A** 975 - 985.

Schneider, D. 1964 Insect antennae. *Annu. Rev. Entomol.* **9** 103 - 122.

Semm, P. & Demaine, C. 1986 Neurophysiological properties of magnetic cells in the pigeon's visual system. *J. Comp. Physiol. A* **159** 619 - 625.

Shcherbakov, V. P. & Winklhofer, M. 1999 The osmotic magnetometer: a new model for magnetite-based magnetoreceptors in animals. *Eur. Biophys. J.* **28** 380–392 (doi: 10.1007/s002490050222).

Slifer, E. H. 1970 The structure of arthropod chemoreceptors. *Annu. Rev. Entomol.* **15** 121 - 142. (doi:10.1146/annurev.en.15.010170.001005).

Slowik, T. J. & Thorvilson, G. 1996 Localization of subcuticular iron-containing tissue in the red imported fire ant. *Southwestern Entomol.* **21** 247 -253.

Staudacher, E. M., Gebhardt, M. & Durr, V. 2005 Antennal Movements and Mechanoreception: Neurobiology of Active Tactile Sensors. *Adv.Insect Physiol.* **32** 50 - 199.

Stort, A. C. & Moraes-Alves, M. M. 1999 Differences in the number of antennal sensory structures of males of three honey bee types. *Rev. Bras. Biol.* **59** (doi: 10.1590/S0034-71081999000100020).

Thurm, U. 1963 Die Beziehungen zwischen mechanischen Reizgrößen und stationären Erregungszuständen bei Borstenfeld-Sensillen von Bienen. . *Z. Vergl. Physiol.* **46** 351 - 382.

Thurm, U. 1964 Mechanoreceptors in the cuticle of the honey bee: fine structure and stimulus mechanism. . *Science* **14** 1063 - 1065. (DOI: 10.1126/science.145.3636.1063).

Towe, K. M. 1985 *Studying mineral particulates of biogenic origin by transmission electron microscopy and electron diffraction: some guidelines and suggestions.* , In Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms. A New Biomagnetism (ed. J. L. Kirschvink, D. S. Jones and B. J. Macfadden), pp. 167–181. New York, London: Plenum Press.:

Tsujiuchi, S., Sivan-Loukianova, E., Eberl, D. F., Kitagawa, Y. & Kadowaki, T. 2007 Dynamic Range Compression in the Honey Bee Auditory System toward Waggle Dance Sounds. *PLoS ONE* **2** e234 - e244. (doi:10.1371/journal.pone.0000234.g002).

- Vácha, M.** 1997 Magnetic orientation in insects. *Biologia* **52** 629 - 636.
- Vargas, J. M., Lima Jr, E., Zysler, R. D., Duque, J. G. S., De Biasi, E. & Knobel, M. 2008 Effective anisotropy field variation of magnetite nanoparticles with size reduction. *Eur. Phys. J. B* **64** 211 - 218. (doi: 10.1140/epjb/e2008-00294-6).
- Vilches-Troya, J.**, Dunn, R. F. & O'Leary, D. P. 1984 Relationship of the vestibular hair cells to magnetic particles in the otolith of the guitarfish sacculus. *The journal of comparative neurology* **226** 489 - 494. (doi: 10.1002/cne.902260404).
- Vonsovskii, S. V.** 1966 *Ferromagnetic resonance.* , Oxford: Pergamon Press
- Vowles, D. M.** 1954 The orientation of ants II. Orientation to light, gravity and polarized light. *Journal of Experimental Biology* **31** 356 - 375.
- Wajnberg, E.**, Acosta-Avalos, D., El-Jaick, L. J., Abraçado, L., Coelho, J. L. A., Bazukis, A. F., Morais, P. C. & Esquivel, D. M. S. 2000 Electron Paramagnetic Resonance Study of the Migratory Ant *Pachycondyla marginata* abdomens. . *Biophysical Journal* **78** 1018 -1023. (doi:10.1016/S0006-3495(00)76660-4).
- Wajnberg, E.**, Cernicchiaro, G. R. & Esquivel, D. M. S. 2004 Antennae: the strongest magnetic part of the migratory ant. *Biometals* **17** 467-470. (DOI: 10.1023/B:BIOM.0000029443.93732.62).
- Walcott, B.** 1985 *The cellular localization of particulate iron.*, In: Kirschvink, J.L., Jones, D.S., MacFadden, B.J. (Eds.), Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms: A new biomagnetism. Plenum Press, NewYork, pp. 417–438.:
- Waldow, U.** 1970 Elektrophysiologische Untersuchungen an Feuchte-, Trocken- und Kälterezeptoren auf der Antenne der Wanderheuschrecke *Locusta*. . *Z. Vergl. Physiol.* **69** 249 - 283.
- Walker, M. M.**, Diebel, C. E., Haugh, C. V., Pankhurst, P. M., Montgomery, J. C. & Green, C. R. 1997 Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature* **390** 371 - 376. (doi:10.1038/37057).
- Wehner, R.** 1997 *The ant's celestial compass system: spectral and polarization channels.*, In: Orientation and Communication in Arthropods (Ed. by M. Lehrer), pp. 145e185. Basel: Birkhäuser-Verlag:
- Wehner, R.**, Michel, B. & Antonsen, P. 1996 Visual navigation in insects: coupling of egocentric and geocentric information. . *J. Exp. Biol.* **199** 129 - 140.
- Weiss, B. P.**, Kim, S. S., Kirschvink, J. L., Kopp, R. E., Sankaran, M., Kobayashi, A. & Komeili, A. 2004 Ferromagnetic resonance and low-temperature magnetic tests for biogenic magnetite. *Earth Plan. Sci. Let.* **224** 73 - 89. (doi:10.1016/j.epsl.2004.04.024).
- Wertz, J. E.** & Bolton, J. R. 1972 *Electron spin resonance.*, New York: McGraw-Hill.:

Wiltschko, R., Munro, U., Ford, H., Stapput, K. & Wiltschko, W. 2008 Light-dependent magnetoreception: orientation behaviour of migratory birds under dim red light. *J. Exp. Biol.* **211** 3344 - 3350. (doi:10.1242/jeb.020313).

Wiltschko, W., Munro, U., Ford, H. & Wiltschko, R. 1993 Magnetic inclination compass: A basis for the migratory orientation of birds in the Northern and Southern Hemisphere. *Cell Molec. Life Sci.* **49** 167 - 170. (doi: 10.1007/BF01989423).

Wiltschko, W. & Wiltschko, R. 1995 *Magnetic orientation in animals*, Berlin: Springer Verlag

Wiltschko, W. & Wiltschko, R. 2005 Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *J. Comp. Physiol. A* **191** 675 - 693 (DOI 10.1007/s00359-005-0627-7).

Winklhofer, M. 1999 Modelle hypothetischer Magnetfeldrezeptoren auf der Grundlage biogenen Magnetits, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Yahiaoui, E. M., Berger, R., Servant, Y., Kliava, J., Cugunov, L. & Mednis, A. 1994 Electron paramagnetic resonance of Fe⁺³ ions in borate glass computer simulation. *J. Phys. Condens. Matter.* **6** 9415 - 9428. (doi: 10.1088/0953-8984/6/44/020).

Yorozu, S., Wong, A., Fischer, B. J., Dankert, H., Kernan, M. J., Kamikouchi, A., Ito, K. & Anderson, D. J. 2009 Distinct sensory representations of wind and near-field sound in the *Drosophila* brain. *Nature* **458** 201 - 206. (doi:10.1038/nature07843).

Zacharuk, R. Y. 1985 *Antennae and sensilla*, Oxford: Pergamon Press

Zacharuk, R. Y. 1980 Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annual Review Entomology* **25** 27- 47 (doi:10.1146/annurev.en.25.010180.000331).