

CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL MAGNÉTICO EN LAS PARTES DE LA ABEJA SIN AGUIJÓN *S. QUADRIPUNCTATA*: UN ESTUDIO POR RESONANCIA FERROMAGNÉTICA Y MAGNETOMETRÍA SQUID

Marcelo J. Lucano

Instituto de Investigaciones Físicas, UMSA

RESUMEN

Material magnético en las partes de la abeja sin aguijón *Schwarziana quadripunctata*, cabeza, par de antenas, tórax y abdomen fueron investigados a través de magnetometría SQUID y Resonancia Ferromagnética (RFM). Las magnetizaciones de saturación J_S , remanencia J_R y campo coercivo son determinadas de las curvas de histéresis. A partir de los valores de H_C y J_R/J_S es estimado el tamaño de las partículas. El valor de J_S y el área de los espectros de absorción de RFM dan como resultado $23 \pm 3\%$, $45 \pm 5\%$, $15 \pm 2\%$ y $19 \pm 4\%$ de contribución de material magnético de la cabeza, par de antenas, tórax y abdomen, respectivamente; similar a aquellos observados en la hormiga migratoria *Pachycondyla marginata*. Este resultado es discutido a la luz de la hipótesis de la antena como estructura magnetoreceptora.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años, desde la observación de magnetosomas conteniendo nanopartículas de magnetita biomineralizadas en la bacteria magnetotáctica (Blakemore 1975) varios estudios en diferentes campos han sido desarrollados con el propósito de entender la orientación geomagnética en los organismos. Experimentos comportamentales fueron realizados en diferentes especies de animales (Wiltschko & Wiltschko 1995; Vacha & Soukopalova 2004; Wiltschko et al. 2004) intentando comprender el mecanismo que envuelve este fenómeno. En particular, estudios extensivos en insectos se han enfocado en la abeja de miel *Apis mellifera*. La correlación entre el comportamiento de esta abeja y el campo geomagnético fue probado por primera vez en 1968 (Lindauer & Martin 1968). Posteriormente, material magnético fue observado en el cuerpo de esta abeja usando magnetómetros superconductores apuntando a un posible mecanismo conformado por minúsculas partículas actuando como un sensor magnético (Gould et al. 1978). Trofocitos conteniendo hierro fueron encontrados en el cuerpo de abejas adultas (Kuterbach & Walcott 1986), identificados como partículas de magnetita superparamagnética (SPM) (Hsu & Li 1994); sin embargo, este resultado no fue reproducido. Material electrónicamente denso encontrado en los pelos del abdomen de la abeja de miel fueron propuestos como partículas de magnetita monodominio (SD) o superparamagnética (SPM) (Schiff 1991) y una hipótesis de aprendizaje asociativo visual y magnético fue desarrollado (Schiff & Canal 1993). La presencia de partículas de hierro fue reportada por microscopía óptica y electrónica en los trofocitos de la abeja adulta sin aguijón *Scaptotrigona postica* (Cunha et al. 1987). Mas recientemente, fue propuesto que gránulos ricos en hierro encontrados en el cuerpo grasoso de las abejas reina *A. mellifera* e *S. postica* están formadas de moléculas de

holoferritina con fosfato inorgánico y calcio (y magnesio en la *S. postica*) con diámetros menores que aquellos descritos anteriormente en la literatura (Keim et al. 2002).

La motivación para la búsqueda de tal sensor magnético debería ser la confirmación de que el comportamiento de la especie es sensible al campo geomagnético. El primer paso es detectar y localizar las nanopartículas magnéticas como posibles magnetoreceptores, determinando sus propiedades magnéticas. El siguiente paso, más complejo, es entender el proceso fisiológico que esta envuelto en el mecanismo de magnetorecepción. Este parece ser el caso de la abeja *Schwarziana quadripunctata* para la cual los efectos del campo magnético fueron observados en la frecuencia de salida del nido (Nascimento et al. 2001). En este trabajo se presentan las medidas hechas a temperatura ambiente (TA) con las técnicas de magnetometría SQUID y Resonancia Ferromagnética en las partes del cuerpo de la abeja *S. quadripunctata*, apuntando a la existencia de un posible magnetoreceptor.

2. MÉTODOS Y MATERIALES

La abeja meliponini *S. quadripunctata* nativa de la Mata Atlántica fue colectada de su nido localizado bajo tierra en Teresópolis, Rio de Janeiro-Brasil, a una altura de 1000 m encima del nivel del mar e intensidad de campo geomagnético 0,238 Oe, inclinación -32° y declinación $-20^\circ 30'$. Forrajeadoras adultas fueron colectadas en el verano de 2004 entre las 8 – 13 h, periodo de máxima actividad e optimo rango de temperatura de vuelo ($21-26^\circ\text{C}$) (Imperatriz-Fonseca & Darakjian 1994). Las abejas fueron colectadas vivas, colocadas en un refrigerador y después de una semana transferidas a un conservante de tejidos de cacodilato 0,1 M pH 7,4. Diez individuos fueron usados sin los miembros torácicos. Dos grupos de cuatro abejas cada uno fueron separados en

TABLA 1

Parámetros magnéticos de una abeja *S. quadripunctata** y partes de su cuerpo#.

	Entera (control)	Cabeza	Antenas	Tórax	Abdómen
J_s (10^{-6} emu)	3.3 ± 0.4	1.1 ± 0.3	2.1 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.5
H_c (Oe)	43 ± 15	32 ± 8	130 ± 5	44 ± 18	90 ± 20
J_r (10^{-7} emu)	2.0 ± 0.8	1.4 ± 0.4	5 ± 0.5	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.4
χ (10^{-9} emu/Oe)	-4.2 ± 0.5	-2 ± 0.2	$+0.4 \pm 0.1$	-3.6 ± 0.2	-1.6 ± 0.2
J_r/J_s	0.06 ± 0.03	0.12 ± 0.06	0.24 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.09 ± 0.03
Magnético %	—	$44 \pm 4\%$	$23 \pm 3\%$	$15 \pm 2\%$	$19 \pm 4\%^\ominus$
S (10^8 a u.)	—	2.1 ± 0.1	5 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1
FMR %	—	$47 \pm 3\%$	$20 \pm 1\%$	$16 \pm 1\%$	$16 \pm 1\%$

* valor medio de dos abejas

valor medio de cuatro partes

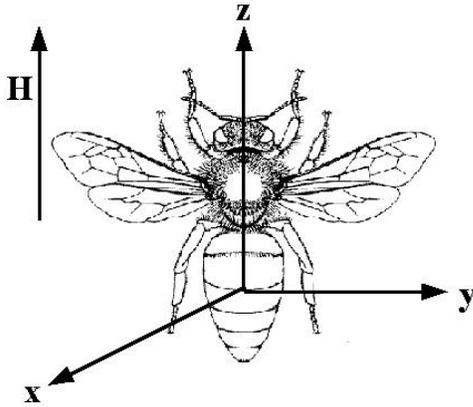
 \ominus tomando el valor de J_s de las abejas de control, este valor se incrementa a 30 %

Figura 1. Orientación del insecto relativa al campo magnético.

cuatro partes: cabeza, par de antenas, tórax y abdomen para las medidas de SQUID y RFM. Para minimizar la contaminación, fueron utilizados instrumentos inoxidable. Fueron conservadas dos abejas enteras para medidas de control. Solo dos individuos enteros caben en el porta muestras para el magnetómetro SQUID. Antes de todas las medidas, las muestras fueron secadas a 50°C por una hora. Cuatro unidades de cada parte del cuerpo fueron orientadas una cerca de la otra y fijadas con cinta kapton y sobre un porta muestra de teflón para las medidas de SQUID y RFM respectivamente. Espectros de RFM en la banda-X (Bruker ESP 300E) con potencia de microonda de 4 mW y modulación de amplitud de campo de 2,018 Oe y curvas de histéresis (magnetómetro SQUID MPMS-XL Quantum Design) fueron obtenidos a temperatura ambiente con el campo magnético aplicado paralelo al eje largo del cuerpo del insecto, como mostrado en la Figura 1. Las áreas de los espectros de absorción de RFM (segunda integral de la derivada del espectro)

fueron calculadas con un programa desarrollado usando el lenguaje gráfico LabVIEW[®], comenzando en campos altos, donde la línea de base está mejor definida.

3. RESULTADOS

Las curvas de histéresis presentan una línea recta con pendiente positiva o negativa en campos altos debida a la contribución paramagnética o diamagnética, respectivamente. La abeja entera, cabeza, tórax y abdomen presentan una contribución diamagnética (figura no mostrada) mientras que las antenas presenta una contribución

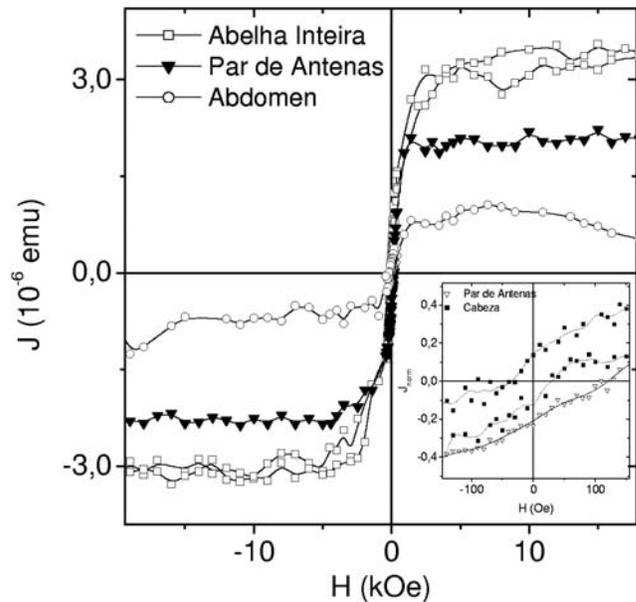


Figura 2. Curvas de histéresis a temperatura ambiente de la abeja entera *S. quadripunctata*, par de antenas y abdomen, orientadas paralelas al campo magnético, normalizadas a un individuo y a una parte. Detalle: región de campo bajo de la cabeza (línea punteada) y de las antenas (línea sólida) normalizadas a las curvas de histéresis.

paramagnética. Las susceptibilidades dia/paramagnéticas (Tabla 1) son obtenidas a través de un ajuste lineal de la curva en valores de campo magnético mayores que aquellos en que se alcanza la saturación ferromagnética y esta contribución es substraída. La Figura 2 presenta las curvas de histéresis a TA normalizadas a una parte y a un individuo, con la mayor contribución proveniente del par de antenas. Por claridad, las curvas del tórax y de la cabeza no se muestran y solo una parte de la curva de las antenas y del abdomen fueron medidas. Los valores de los parámetros magnéticos: magnetización de saturación J_S , magnetización remanente J_R y campo coercivo H_C obtenidos para cada parte del cuerpo y para una abeja están dados en la Tabla 1, incluyendo la razón J_R/J_S .

La media de la suma de los valores de J_S de cada parte, $4,8 \pm 1,4 \cdot 10^{-6}$ emu, fue tomada para calcular la contribución porcentual de J_S como $44 \pm 4\%$, $23 \pm 3\%$, $15 \pm 2\%$, $19 \pm 4\%$, para las antenas, cabeza, tórax y abdomen, respectivamente. Considerando las diferencias de contenido de material magnético entre los individuos y los errores experimentales, el total J_S está en buen acuerdo con la media J_S de las dos abejas usadas como control.

La región de campo bajo de las histéresis de la cabeza y de las antenas en la Figura 2, normalizadas a sus valores de J_S , están dados en el detalle. Las antenas presentan los valores mas altos de H_C (130 Oe) y razón J_R/J_S (0,09-0,12) en relación a las otras partes. Considerando la magnetita como el material de las partículas, el tamaño de las partículas en la antena están entre 0,037 y 0,10 μm , mientras que las otras partes del cuerpo son aproximadamente 0,22 μm (Ozdemir et al 2002).

La Figura 3 muestra los espectros de RFM de las partes del cuerpo de la abeja con el campo magnético orientado paralelo al eje largo del cuerpo. El diamagnetismo no contribuye en los espectros de RFM mientras que el paramagnetismo si y no puede ser substraído, como en el caso de las curvas de histéresis. El espectro de las cuatro partes presentan una componente ancha en campo alto CA (ancho de línea 550 – 900 Oe), centrado alrededor de 3000 Oe. La intensidad de la componente en CA de la antena es mayor que en las otras partes del cuerpo. Solo el espectro de la antena claramente presenta otra componente en campo bajo, CB, centrada alrededor de 1300 Oe. Los valores de las áreas de absorción S , (la segunda integral de la derivada de los espectros de RFM) de las partes de la abeja *S. quadripunctata* están dados en la Tabla 1.

Los valores de S calculados con el programa de aplicación WINEPR (Bruker) no son preciso cuando una componente se extiende a valores menores de campo cero, como en el caso del espectro de la antena. El programa especialmente desarrollado usado en este trabajo, corrige la suposición de campo de intensidad cero para el primer valor del campo, integrando de valores de campo alto a valores de campo bajo. Aun así, el valor de S de las antenas es un límite inferior debido a que la línea en CB esta incompleta y la contribución respectiva no

puede ser completamente calculada.

Los valores de S de las componentes CA a TA están relacionadas a la cantidad de material magnético, como mostrado por su relación lineal con la magnetización de saturación en el caso de las termitas (Oliveira et al. 2005). La correlación entre la intensidad integrada y la magnetización también fue observada en nanopartículas de Si dopadas con ferrihidrita (Seehra et al. 2001). Tomando S como proporcional al numero de spins resonantes en la muestra, los porcentajes de material magnético en cada parte son $47 \pm 3\%$, $20 \pm 1\%$, $16 \pm 1\%$ y $16 \pm 1\%$ en las antenas, cabeza, tórax y abdomen respectivamente. Estos valores están en buen acuerdo con aquellos dados arriba, obtenidos por magnetometria SQUID.

4. DISCUSIÓN

La magnetorecepción es un mecanismo de percepción y transducción de campo usado para la orientación de un organismo. Dos hipótesis se han formulado para explicar este mecanismo: una considerando reacciones bioquímicas moduladas por el magnético y otra a través de la presencia de partículas magnéticas biogénicas que actúan como magnetosensores. Hasta el momento, mucho de lo que es conocido acerca de este mecanismo ha sido acumulado con experimentos comportamentales, propuestas teóricas y unos pocos estudios anatómicos y electrofisiológicos (Lohmann & Johnsen 2000). Los estudios recientes sugieren por lo menos el involucramiento de por lo menos dos tipos de receptores para obtener la in-

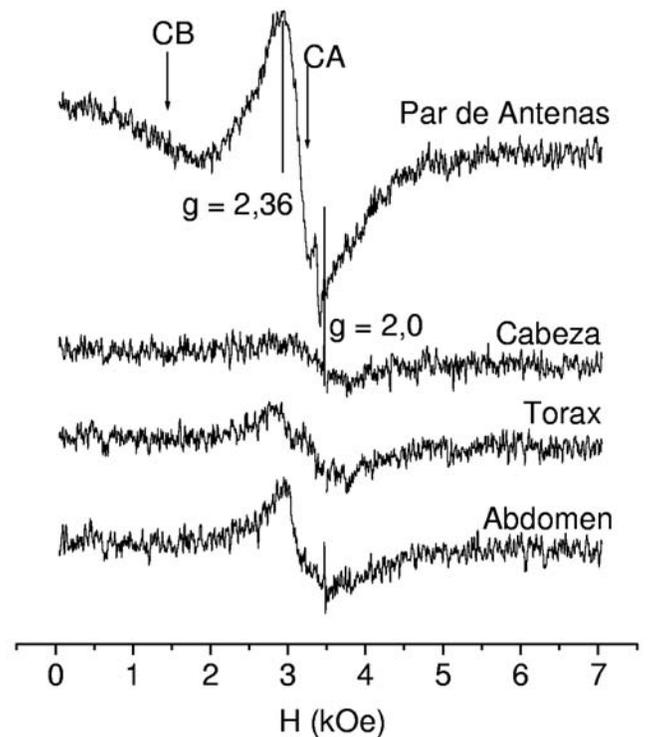


Figura 3. Espectros de resonancia ferromagnética a temperatura ambiente en la banda X de las partes de la abeja *S. quadripunctata*. Las líneas son guías para los ojos.

formación magnética, interactuando estos receptores de una forma compleja (Wiltschko et al. 2004). Partículas biogénicas de magnetita han ganado relevancia ya que su presencia ha sido reportada en varias especies de animales (Wiltschko & Wiltschko 1995; Safarik & Safarikova 2002), pero su conexión a estructuras nerviosas aun debe ser comprobada. A pesar de la dificultad de localizar estos diminutos magnetoreceptores, que pueden estar dispersos en cualquier lugar del cuerpo del animal, la magnetometría SQUID y RFM pueden ser utilizadas para caracterizar sus propiedades en algunos insectos sociales (Wajnberg et al. 2000; El-Jaick et al. 2001; Esquivel et al. 2002; Alves et al. 2004; Esquivel et al. 2004; Wajnberg et al. 2004; Oliveira et al. 2005a).

En este artículo, ambas técnicas fueron utilizadas para estudiar las partes del cuerpo de la abeja *S. quadripunctata*. Las componentes CA e CB de los espectros de RFM presentes en las partes de esta abeja ya han sido observadas en el abdomen de la abeja *A. mellifera* y hormiga *P. marginata* y han sido asociadas a nanopartículas de magnetita aisladas y agregadas respectivamente. (Wajnberg et al. 2000; El-Jaick et al. 2001). Más aun, las cantidades relativas de material magnético obtenidas a través de J_S y S están en buen acuerdo, confirmando la utilidad de las técnicas al comparar cantidades de material magnético a temperatura ambiente. El análisis conjunto del material magnético con ambas técnicas en todas las partes del cuerpo da como resultado $23 \pm 3\%$, $45 \pm 5\%$, $15 \pm 2\%$ y $19 \pm 4\%$ de contribución de material magnético de la cabeza, antenas, tórax y abdomen, respectivamente. Ambos resultados apuntan a una mayor cantidad de material magnético en las antenas.

Hasta donde se conoce este es el primer estudio de material magnético en todas las partes del cuerpo además de la abeja *Apis mellifera*, la más estudiada, además de observaciones de microscopía óptica y electrónica en abdómenes de la abeja *S. postica* (Cunha et al. 1987; Keim et al. 2002). Pocos resultados previos de RFM (Tagaki 1995), El-Jaick et al. 2001 confirmaron la presencia de material ferromagnético y paramagnético en abdómenes de la abeja *A. mellifera*, sin medir otras partes del cuerpo. Por otro lado, medidas magnéticas de abejas *A. mellifera* enteras (Oliveira et al. 2005a), partes del cuerpo (Tagaki 1995) y particularmente abdómenes (Esquivel et al. 2002) han mostrado la presencia de partículas magnéticas superparamagnéticas y más grandes o agregados en esta parte del cuerpo.

Los tamaños estimados de las partículas en el abdomen de la abeja *S. quadripunctata* (~ 220 nm) están en buen acuerdo con el rango de tamaño de 40 – 160 nm de los gránulos de hierro encontrados en otra abeja sin aguijón *S. postica* (Cunha et al. 1987), a pesar de haber sido observados gránulos de tipo ferritina como partículas electrodensas midiendo $2,1 \pm 0,5$ nm en su abdomen (Keim et al. 2002). Debe darse especial atención a la contribución del material ingerido en el tórax y el abdomen, el cual no es biomineralizado, y puede ser la causa de la diferencia de tamaño y concentración de las na-

nopartículas en el abdomen. Por otro lado, el material de la cabeza y de las antenas solo puede ser el resultado de un proceso de biomineralización, que desde un punto de vista evolucionario puede producir partículas de tamaño y geometría más eficiente. También es interesante notar que la hormiga *Pachycondyla marginata*, cuyo comportamiento migratorio fue relacionado al campo geomagnético (Acosta-Avalos et al. 2001) muestra un resultado similar, con $42 \pm 3\%$ de material magnético en las antenas (Wajnberg et al. 2004).

Hasta donde se conoce, no se han realizado experimentos que conciernan a las antenas como magnetoreceptores para la orientación, sin embargo, fue investigada la sensibilidad de cucarachas y pulgas con y sin antenas a campos electromagnéticos de microondas no uniformes, indicando que estos pueden detectar y responder a la radiación (Ondracek et al. 1976). A pesar de que no necesariamente existe un órgano o estructura específica para la magnetorecepción, las abejas poseen órganos sensoriales complejos, tales como antenas y ojos los cuales deben ser considerados. Las antenas por su vez están compuestas de millones de sensillas, las cuales están conectadas al sistema nervioso central (Dade 1994).

Hace más de una década, partículas de magnetita fueron encontradas en el abdomen de la abeja *A. mellifera* y se sugirió su uso para la orientación magnética (Kirschvink & Walker 1985); sin embargo, la elevada fracción y tamaño de material magnético biomineralizado encontrado en las antenas de la abeja sin aguijón *S. quadripunctata* lleva a especular este órgano como un órgano magnetoreceptor. Estos resultados preliminares deben ser corroborados con más estudios comportamentales y técnicas físicas de caracterización complementares para ser comparados con otras especies de insectos, cuyo comportamiento de orientación se sabe es influenciado por el campo geomagnético.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al grupo de Biofísica del Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), por la disponibilidad de los equipos de medición y las muestras.

REFERENCIAS

- [1] **Acosta-Avalos D, Esquivel DMS, Wajnberg E, Lins de Barros HGP, Oliveira PS, Leal I.** 2001 Seasonal patterns in the orientation system of the migratory ant *Pachycondyla marginata*. *Naturwissenschaften* **88**, 343-6
- [2] **Alves OC, Wajnberg E, Oliveira JF, Esquivel DMS.** 2004 Magnetic material arrangement in oriented termites: a magnetic resonance study. *J Magn Res* **168**, 246-251
Blakemore R. 1975 Magnetotactic Bacteria. *Science* **190**, 377-379
- [3] **Cunha MAS, Walcott B, Sesso A.** 1987 Iron-containing cells in the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). Morphology and ultrastructure. In: Eder J, Rembold H, eds. *Chemistry and Biology of social insects*. Munchen: Verlag: 91.

- [4] **Dade, H. A.** 1994. Anatomy and Dissection of the Honeybee, Cardiff: International Bee Research Association.
- [5] **El-Jaick LJ, Acosta-Avalos D, Esquivel DMS, Wajnberg E, Linhares MP.** 2001 Electron paramagnetic resonance study of honeybee *Apis mellifera* abdomens. *Eur Biophys J* **29**, 579-586
- [6] **Esquivel DMS, Wajnberg E, Cernicchiaro G, Garcia BE, Acosta -Avalos D.** 2002 Magnetic material arrangement in *Apis mellifera* abdomens. *MRS Symposium Proceedings Series* **724**, N7.2.1
- [7] **Gould JL, Kirschvink JL, Deffeyes KS.** 1978 Bees have magnetic remanence. *Science* **201**, 1026-1028
- [8] **Hsu C-Y, Li C-W.** 1994 Magnetoreception in Honeybees. *Science* **265**, 95-96
- [9] **Imperatriz-Fonseca VL, Darakjian P.** 1994 Flight activity of *Schwarziana quadripunctata quadripunctata* (Apidea, Meliponinae): influence of environmental factors. Abstract. In: International Behaviour Ecology Congress, Nottingham (U.K.), 86
- [10] **Keim CN, Cruz-Landim C, Carneiro FG, Farina M.** 2002 Ferritin in iron containing granules from the fat body of the honeybees *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica*. *Micron* **33**, 53-59
- [11] **Kirschvink JL, Walker MM.** 1985 Particle-size considerations for magnetite-based magnetoreceptors. In: Kirschvink JL, Jones DS, MacFadden BJ, eds. *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organism. A new biomagnetism*. New York: Plenum Press: 243-254.
- [12] **Kuterbach DA, Walcott B.** 1986 Iron containing cells in the honey-bee (*Apis mellifera*). I. Adult morphology and physiology. *J Exp Biol* **126**, 375-387
- [13] **Lindauer M, Martin H** 1968. Die Schwereorientierung der Biene unter dem Einfluss des Erdmagnetfeldes. *Z Vergl Physiol* **60**, 219-243
- [14] **Lohmann KJ, Johnsen S.** 2000 The neurobiology of magnetoreception in vertebrate animals. *Trends Neurosc* **23** (4), 153-169
- [15] **Nascimento FS, Barbosa MA, Eizemberg R, Wajnberg E, Esquivel DMS.** 2001 Efeitos do campo geomagnético no comportamento de abelhas nativas da Mata Atlântica. Abstract. In: XIX Congresso Brasileiro de Etologia, Juiz de Fora (Br)
- [16] **Ondracek J, Zdarek J, Landa V, Datlov I.** 1976 Importance of antennae for orientation of insects in a non-uniform microwave electromagnetic field. *Nature* **260**, 522-523
- [17] **Oliveira JF, Wajnberg E, Esquivel DMS, Alves OC.** 2005 Magnetic resonance as a technique to magnetic biosensors characterization in *Neocapritermes opacus* termites. *J Magn Magn Mater* (in press doi:10.1016/j.jmmm.2005.03.078)
- [18] **Oliveira JF, Cernicchiaro GR, Winklhofer M, Dutra H, Oliveira PS, Esquivel DMS, Wajnberg E.** 2005a Comparative magnetic measurements in social insects. *J Magn Magn Mater* **289C**, 442-444
- [19] **Ozdemir O, Dunlop DJ, Moskowitz BM** 2002 Changes in remanence, coercivity and domain state at low temperature in magnetite. *Earth Planet Sc Lett* **194**, 343-358
- [20] **Safarik I, Safarikova M.** 2002 Magnetic nanoparticles and Biosciences. *Monatsh Chem* **133**, 737-759
- [21] **Schiff H.** 1991 Modulation of spike frequencies by varying the ambient magnetic field and magnetite candidates in bees (*Apis mellifera*). *Comp Biochem Physio.* **100 A** (4), 975-985
- [22] **Schiff H, Canal G.** 1993 The magnetic and electric field induced by superparamagnetic magnetite in honeybees. *Biol Cybern* **69**, 7-17
- [23] **Seehra M.S., Punoose A., Roy P., Manivannan A.,** IEEE Trans Magn 37 (2001) 2207
- [24] **Takagi S.** 1995 Paramagnetism of honeybees *J Phys Soc Jpn* **64** (11), 4378-4381
- [25] **Vácha M, Soukopová H.** 2004 Magnetic orientation in the mealworm beetle *Tenebrio* and the effect of light. *J Exp Biol* **207**, 1241-1248
- [26] **Wajnberg E, Cernicchiaro G, Esquivel DMS** 2004. Antennae: the strongest magnetic part of the migratory ant. *Biometals* **17**, 467-470
- [27] **Wajnberg, E, Acosta-Avalos D, El-Jaick LJ, Abraçado L, Coelho JLA, Bazukis AF, Morais PC, Esquivel DMS.** 2000 Electron Paramagnetic Resonance study of the migratory ant *Pachycondyla marginata* abdomens. *Biophys. J* **78**, 1018-1023
- [28] **Wiltschko W, Wiltschko R.** 1995 Magnetic Orientation in Animals, Berlin: Springer-Verlag
- [29] **Wiltschko W, Gesson M, Stapput K, Wiltschko R.** 2004 Light Dependent magnetoreception in birds: interaction of at least two different receptors. *Naturwissenschaften* **91**, 130-134