

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

João Gabriel da Silva Soares

Espectroscopia de RMN de Estado Sólido aplicada ao estudo da composição química  
de colônias de formigas cultivadoras de fungos sob diferentes dietas

São Carlos  
2024

João Gabriel da Silva Soares

Espectroscopia de RMN de Estado Sólido aplicada ao estudo da composição química de colônias de formigas cultivadoras de fungos sob diferentes dietas

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo  
Instituto de Física de São Carlos.

São Carlos  
2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

# 1 Resumo

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono-13 em estado sólido tem sido amplamente utilizada para a análise de compostos orgânicos em diversos materiais e com amplas aplicações, como por exemplo a decomposição de biomassa vegetal em jardins de fungo da formiga atínea *Atta sexdens* (formiga cortadeira). O objetivo deste trabalho foi mostrar o potencial da RMN em estado sólido para caracterizar a degradação de biomassa vegetal. As modificações na biomassa vegetal em diferentes compartimentos do sistema de fungicultura têm sido investigadas utilizando colônias de campo de diferentes espécies de atíneas (*Mycocepurus* sp., *Mycetophylax morschi*, *Acromyrmex rugosus* e *Atta sexdens*), revelando particularidades estruturais de cada sistema, mas ainda resta saber se microbiota associada à fungicultura responde a diferentes substratos, ou seja, se é possível estudar a composição química de Colônias de Formigas Cultivadoras de Fungos sob diferentes dietas. Nesta monografia foram realizadas análises das colônias de formigas submetidas a diferentes dietas, ricas em frutas, plantas e equilibradas e foi possível identificar mudanças comportamentais dessas formigas e da estrutura de suas colônias em cada uma delas de maneira não invasiva.

Palavras-chave: Espectroscopia. RMN. Mirmecologia.

## 2 Introdução

### 2.1 O problema das formigas

As formigas cortadeiras, principalmente as dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, são amplamente reconhecidas como "engenheiras de ecossistemas" (Cipriano, 2016) devido à sua capacidade de modificar substancialmente o ambiente. Ao cortar folhas e transportar grande quantidade de material orgânico para seus ninhos, essas formigas exercem um papel vital na ciclagem de nutrientes e na fertilização do solo, especialmente em ecossistemas tropicais e subtropicais. Em regiões com alta biodiversidade, como as florestas tropicais, essas atividades podem influenciar diretamente a estrutura e a composição da vegetação, moldando o ecossistema ao seu redor.

No entanto, as interações dessas formigas com o ambiente vão além de suas práticas de coleta de material. Elas mantêm uma relação simbiótica complexa com fungos, que cultivam em seus ninhos para consumo, utilizando o material vegetal cortado como substrato para esse cultivo. Este sistema de mutualismo entre formigas e fungos não apenas sustenta suas colônias, mas também tem implicações importantes para a dinâmica dos ecossistemas. A ciclagem de nutrientes, dispersão de sementes e controle da vegetação são processos influenciados pela atividade dessas formigas, tornando-as elementos chave para a manutenção e funcionamento do ecossistema. Com

isso, mudanças em sua dieta, seja por fatores naturais ou induzidos por alterações ambientais, podem impactar diretamente esses processos ecológicos.

O estudo da resiliência dessas colônias é particularmente relevante em um contexto de mudanças ambientais, como a perda de habitat e o aquecimento global. Em um cenário de rápidas mudanças climáticas, a capacidade das formigas cortadeiras de adaptar suas práticas de forrageamento e de manter a simbiose com fungos em face de dietas diversificadas ou escassez de recursos vegetais é uma questão central para entender sua sobrevivência e o papel contínuo que desempenham na modulação do ambiente. Esses insetos têm mostrado uma notável capacidade de adaptação, mas queimadas, aquecimento global e a destruição de florestas para extrativismo ou expansão de indústrias cria uma pressão crescente sobre os ecossistemas tropicais e subtropicais levanta questões sobre o futuro das interações entre formigas, plantas e fungos e, conseqüentemente, sobre a integridade desses ecossistemas.

Além disso, o impacto das formigas cortadeiras se estende às atividades humanas, especialmente na agricultura. Em muitas regiões agrícolas, elas são consideradas pragas devido ao seu apetite voraz por material vegetal, o que pode resultar em grandes perdas de colheitas. Estudar suas preferências alimentares e os fatores que as influenciam é fundamental para o desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes e sustentáveis. Métodos tradicionais, como o uso de pesticidas, muitas vezes têm efeitos colaterais prejudiciais ao meio ambiente, contaminando solos e fontes de água. Portanto, uma abordagem que integre o conhecimento sobre a biologia e ecologia dessas formigas com técnicas de resolução molecular, como o uso de Ressonância Magnética Nuclear, pode abrir caminhos para soluções de controle de pragas que não dependam de químicos nocivos.

A RMN oferece uma maneira não invasiva de caracterizar as amostras biológicas, já tendo sido utilizada anteriormente para identificar colônias de diferentes espécies de formigas. Essa técnica tem o potencial de fornecer informações detalhadas sobre a composição química, possibilitando uma compreensão mais profunda dos mecanismos que permitem a adaptação e a resiliência dessas espécies frente a variações em sua dieta.

## 2.2 Princípios de RMN e Técnicas Utilizadas

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica que se baseia no monitoramento da resposta dos momentos angulares dos núcleos atômicos quando submetidos a campos magnéticos. A técnica permite determinar a estrutura e a composição química de uma amostra. O método foi originalmente proposto por Felix Bloch e Edward Purcell em 1946 (Giunta2020), e desde então se tornou uma ferramenta muito importante para química, bioquímica, física e ciências médicas.

A teoria da mecânica quântica é essencial para descrever o fenômeno da RMN (Keeler2010). Os núcleos atômicos que têm momentum angular não nulo (referido como spin nuclear)  $\vec{L}$ , têm a eles associados um momento magnético nuclear  $\vec{\mu} = \gamma\vec{L}$ . A constante  $\gamma$  é chamada de constante giromagnética e depende do tipo de núcleo (por exemplo,  $\gamma = 42,5 \frac{MHz}{T}$  para núcleos de  $^1H$  e  $\gamma = 10,7 \frac{MHz}{T}$  para núcleos de  $^{13}C$ ). Quando um núcleo atômico é colocado em um campo magnético estático, a interação entre o campo magnético e os momento magnéticos nucleares faz com que sua energia magnética seja dividida em vários níveis, associados a diferentes estados de spin nuclear, fenômeno conhecido como Efeito Zeeman nuclear. A diferença de energia entre os estados Zeeman é conhecida como frequência de Larmor, sendo proporcional à intensidade do campo magnético aplicado e da constante giromagnética. A separação entre níveis Zeeman é dada por  $\Delta E_Z = \hbar\gamma B_0$  (Haake2014).

Uma vez que a separação de energia entre os estados de spin nuclear é geralmente muito menor que a energia térmica  $k_B T$ , em uma amostra a temperatura  $T$  os momentos magnéticos nucleares podem ocupar os distintos níveis de energia, sendo a população em cada nível definida pela distribuição de Boltzman-Gibbs. Por exemplo para núcleos com spin nuclear  $\frac{1}{2}$ , que possuem dois níveis de energia, a razão entre a população entre os dois níveis é  $\frac{N_-}{N_+} = \exp(-\frac{\hbar\gamma B_0}{k_B T})$ . Essa diferença de população entre os níveis implica no aparecimento de uma magnetização macroscópica  $\vec{M}_0$  na direção do campo magnético aplicado  $\vec{B}_0$ . Como essa magnetização macroscópica é proporcional a diferença de população entre os níveis, ela aumenta com o campo magnético e diminui com a temperatura do sistema.

Para os campos magnéticos tipicamente utilizados em RMN ( $< 25T$ ), a separação entre os níveis de energia está na faixa de energia de ondas de rádio, usualmente referidas como radio frequência (RF). Assim, em RMN a excitação dos núcleos atômicos é feita utilizando-se uma onda de rádio com frequência  $f_{RF}$  adequadamente escolhida para corresponder aproximadamente as frequências de Larmor do núcleos de interesse, ou seja,  $f_{RF} = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$ , conhecida como condição de ressonância. Quando um pulso de RF é aplicado na condição de ressonância, ocorre a absorção da radio-frequência fazendo com que haja transições entre os níveis de energia. Tal processo produz uma mudança na direção do momento magnético dos núcleos, resultando na rotação da magnetização em torno do campo magnético da radiofrequência. Se o campo de RF é mantido ligado durante um tempo  $t_p$  (pulso de RF) a rotação da magnetização ocorre de um ângulo específico definido pela amplitude do campo magnético e pela duração do pulso  $\theta = \gamma B_1 t_p$ . (Haake2014)(KSR2012)

O sinal de RMN é basicamente uma medida da magnetização macroscópica devido aos núcleos. Para detectar esse sinal utiliza-se uma sistema de detecção constituído por uma bobina (com eixo transversal a direção do campo magnético) e um circuito eletrônico ressonante, cuja frequência de ressonância pode ser ajustada para a frequência de ressonância do sistema de spins nucleares.

Esse mesmo sistema é utilizado para aplicar os pulsos de RF. A detecção é feita baseada na Lei de Faraday Lenz (Haake2014) e o que é detectado é uma corrente elétrica resultante da variação do fluxo magnético no eixo da bobina de detecção. Assim, para detectar a magnetização macroscópica da forma mais eficiente é necessário primeiro fazer com que ela fique perpendicular ao campo magnético  $\vec{B}_0$ , já que o eixo da bobina de detecção é transversal a esse campo. Como mencionado, isso pode ser conseguido aplicando um pulso de RF em ressonância e ajustando a duração do pulso para que o ângulo de rotação seja de  $\frac{\pi}{2}$ , ou seja,  $t_p = \frac{\pi}{2\gamma B_1}$ . Após o pulso, a magnetização macroscópica, agora denominada de magnetização transversal  $M_T$ , é deixada evoluir livremente na presença do campo magnético  $\vec{B}_0$ . Pode-se mostrar que essa evolução ocorre como uma precessão em torno do campo magnético com a frequência de ressonância do sistema, o que faz com que o fluxo magnético ao longo do eixo da bobina varie com essa mesma frequência. O resultado, é que a corrente elétrica que aparece na bobina oscila no tempo com essa mesma frequência e sua intensidade é proporcional a magnetização transversal. A esse sinal dá-se o nome de Decaimento Livre da Indução (FID, do termo em inglês *Free Induction Decay*).

Em uma amostra real, as frequências de ressonância dos spins nucleares são afetadas por vários fatores, por exemplo os campos magnéticos locais produzidos pelos elétrons dos orbitais moleculares a que o núcleo pertence e pela interação dipolar magnética do momento magnético nuclear do núcleo detectado com os momentos magnéticos dos núcleos vizinhos. Essas modificações nas frequências de ressonância por essas chamadas interações internas são o coração da espectroscopia por RMN, já que são elas que carregam a informação sobre a estrutura e dinâmica das moléculas da amostra. Por outro lado, isso faz com que o sinal de RMN não seja uma oscilação de frequência única, mas uma soma de oscilações correspondendo as diferentes frequências de ressonância dos spins nucleares. Assim, é virtualmente impossível obter as frequências de ressonâncias diretamente do sinal FID. Para isso, utiliza-se uma ferramenta matemática amplamente aplicada em análise de sinais, a denominada transformada de Fourier. A transformada de Fourier provê basicamente uma mudança no espaço de representação do sinal do domínio do tempo para o domínio de frequências, possibilitando detectar as diferentes frequências de ressonância dos spins e uma amplitude relativa a cada uma delas, que é proporcional a quantidade de spins que contribuem para aquela frequência. Esse é o chamada espectro de RMN cuja análise pode ser utilizada para obter informações sobre a estrutura e dinâmica dos materiais.

Essas características da espectroscopia de RMN fazem com que a técnica seja capaz de fornecer informações valiosas sobre a estrutura e a dinâmica molecular de uma ampla gama de amostras, principalmente sólidos e líquidos. A técnica é usada em muitos campos diferentes, desde a química orgânica e inorgânica até a biologia estrutural e a física de materiais. Em resumo, a RMN é uma técnica poderosa que fornece informações detalhadas sobre a estrutura e a dinâmica molecular de

uma amostra e tem uma ampla gama de aplicações em muitos campos da ciência.

### 2.2.1 Interações entre spins nucleares importantes para RMN de estado sólido de núcleos com spin 1/2

Como descrito na seção anterior, a informação primordial provida pela espectroscopia de RMN advém das interações a que os spins nucleares estão submetidas. Como os momentos magnéticos nucleares respondem a campos locais internos eles afetam os sinais de RMN. Os campos locais podem ter diferentes origens físicas, portanto informações distintas são codificadas dependendo do tipo de interação que os estão produzindo. Durante este trabalho somente foi feita a detecção de núcleos com spin 1/2 em materiais em estado sólido, onde as interações importantes são (Levitt2002):

**Deslocamento químico:** Os elétrons ao redor do núcleo reagem ao campo magnético estático em qual a amostra está imersa criando um campo magnético extra na posição do núcleo. Este campo extra se compõe com ao campo principal aplicado  $\vec{B}_0$ , produzindo uma mudança na frequência de ressonância. Uma vez que é criado pelos elétrons do orbital molecular, a mudança de frequência depende da simetria, orientação e densidade eletrônica desse orbital, o que a torna sensível ao grupo químico onde o núcleo está localizado, por isso o nome deslocamento químico. Uma vez que as mudanças na frequência de ressonância devido aos deslocamentos químicos é muito pequena, ela é usualmente medida em parte por milhão da frequência de ressonância principal, o que é referido como ppm. Mais especificamente, o valor de ppm indica a frequência dos núcleos  $^{13}\text{C}$  em relação a um padrão de referência. Por exemplo, se um composto tem um sinal de RMN de estado sólido  $^{13}\text{C}$  a 100 ppm, significa que a frequência desse sinal é 100 partes por milhão acima da frequência do sinal de referência, que é normalmente o sinal do carbono tetrametilsilano (TMS), cuja frequência é definida como 0 ppm.

Em geral, o deslocamento químico depende da orientação da molécula em relação ao campo magnético principal, a chamada anisotropia de deslocamento químico (CSA), mas em solução, o rápido movimento das moléculas promedia essa dependência com a orientação, e o deslocamento químico se reduz a uma única constante de blindagem, o chamado deslocamento químico isotrópico, que varia de acordo com o grupo químico ao qual o núcleo está submetido. Em outras palavras, os valores dos deslocamentos químicos em RMN são impressões digitais dos grupos químicos, tornando esta uma técnica espectroscópica muito poderosa. No entanto, em amostras em estado sólido essa promediação natural do CSA não acontece e o espectro resultante é muito alargado, geralmente provocando uma superposição significativa entre os espectros de núcleos de diferentes grupos químicos e impedindo que sejam obtidos sinais individuais de cada grupo químico. Feliz-

mente existem técnicas para eliminar essa dependência do deslocamento químico com a orientação e o deslocamento químicos isotrópico pode ser observado mesmo em amostras sólidas, embora com menor resolução.

**Acoplamento dipolar:** A interação magnética dipolo-dipolo entre momentos magnéticos nucleares é referida simplesmente como acoplamento dipolar em RMN. Sua intensidade depende da distância entre os núcleos acoplados, por isso é uma importante sonda de proximidade espacial. É também uma interação anisotrópica, dependendo da orientação entre o vetor internuclear e o campo magnético principal  $\vec{B}_0$ . Porém, diferente do deslocamento químico, tem média zero o que faz com que não seja observado diretamente nos espectros em RMN de Solução, mas pode contribuir como mecanismo de relaxação e relaxação cruzada, o que lhe permite ser usado em muitos experimentos modernos dedicados à determinação estrutural. Por outro lado, em RMN de estado sólido, a anisotropia do acoplamento dipolar introduz um forte alargamento do espectro, que em muitos casos compromete a visualização dos deslocamentos químicos no espectro. No entanto, métodos específicos de RMN, como exemplificado posteriormente, são capazes de minimizar o efeito do acoplamento dipolar RMN, permitindo obter espectros com resolução de deslocamento químico. Além disso, há também técnicas que mantêm as informações de orientação, permitindo codificar informações de estrutura (distâncias) e dinâmicas (mobilidade molecular).

## 2.2.2 Técnicas utilizadas para detecção de espectros de alta resolução de $^{13}\text{C}$ em colônias de formigas

**Desacoplamento Dipolar (DEC):** Como já mencionado, o acoplamento dipolar é uma fonte primária de alargamento espectral em RMN de sólidos, impedindo que os valores de deslocamentos químicos sejam resolvidos no espectro. No entanto, a interação dipolar entre núcleos raros (com baixa abundância natural), como por exemplo  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ , é insignificante e neste caso a interação dipolar importante se dá com os núcleos abundantes, por exemplo,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , o chamado desacoplamento dipolar heteronuclear.

Para suprimir a interação dipolar entre spins raros e abundantes o método utilizado é chamado de desacoplamento heteronuclear e foi proposto por Sarles e Cotes (Sarles1958) em 1958. Em sua forma básica, consiste na irradiação com RF de onda contínua (CW) na frequência de ressonância do núcleo abundante (por exemplo  $^1\text{H}$ ) enquanto observa-se o sinal do núcleo (por exemplo  $^{13}\text{C}$ ). A rotação imposta pela irradiação CW do  $^1\text{H}$  em ressonância promedia o campo magnético dipolar produzido pelo núcleo abundante na posição do núcleo raro. Se a intensidade do campo de RF aplicado for significativamente maior que a intensidade do campo dipolar, a interação dipolar é promediada a zero e não contribuirá para o alargamento do espectro. O método CW pode ser substituído por outras técnicas mais robustas e eficientes, que geralmente envolve modulação de

fase dos pulsos, por exemplo a modulação de fase de dois pulsos (TPPM) e alteração incremental de pequena fase (SPINAL).

**Rotação da Amostra em torno do ângulo mágico:** Andrew e Lowe propuseram independentemente em 1959 um método para suprimir a interação dipolar magnética, que ficou conhecida como Rotação da Amostra em torno do ângulo mágico (MAS do tempo em inglês *Magic Angle Spinning*) (Andrew1958). A técnica foi estendida em 1962 por Andrew e Eades (Andrew1958) para eliminar a parte anisotrópica de outras interações incluindo o deslocamento químico. Considerando por simplicidade a interação dipolar magnética entre núcleos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , a componente do campo magnético dipolar ao longo de  $\vec{B}_0$  produzido pelo núcleo de  $^1\text{H}$  na posição do  $^{13}\text{C}$  é dado por  $B_{dip} \approx \frac{\mu_H}{r^3}(3\cos^2\theta - 1)$ , onde  $r$  é o módulo do vetor internuclear conectando os núcleos, e  $\theta$  é o ângulo entre o vetor internuclear e o campo  $\vec{B}_0$ . O termo  $(3\cos^2\theta - 1)$  descreve a dependência da interação dipolar com a orientação mencionada acima. Assim, se este termo for igual a zero, a interação dipolar é eliminada. Uma maneira de fazer isso é escolher  $\theta = \theta_m = 54,74^\circ$ , que é chamado de ângulo mágico. No entanto, se considerarmos que os possíveis pares de spin  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  na amostra são orientados aleatoriamente, como é em amostras amorfas ou policristalinas, é impossível colocar todos os pares de spin alinhados ao longo desta orientação específica. O método MAS propõe mimetizar esta condição girando a amostra em torno da orientação do ângulo mágico com uma frequência de rotação  $\nu_r$  maior que a frequência associada a interação dipolar, a chamada condição de MAS rápida. Nesta situação, todos os vetores internucleares ficam em média, ao longo da direção mágica resultante em um campo dipolar médio ( $\langle B_{dip} \rangle \approx 0$ ), ou seja, a interação não aparece no espectro de RMN.

O mesmo procedimento também funciona para suprimir a parte anisotrópica da interação do deslocamento (CSA), desde que a frequência de rotação seja maior do que alargamento introduzido pelo CSA. Para sistemas MAS usuais, o  $\nu_r$  máximo é de cerca de 15 kHz. Nesta situação, é relativamente fácil suprimir o CSA nos espectros  $^{13}\text{C}$  (cujos valores típicos de dispersão do CSA está na faixa de 1-10 kHz). No entanto, não seria possível suprimir a interação dipolar  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ . No entanto, como discutido abaixo, o MAS pode ser usado em conjunto com o desacoplamento dipolar, que pode ser muito eficaz eliminando a interação dipolar  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ . Esse uso simultâneo das duas técnicas, permite que espectros de  $^{13}\text{C}$  constituídos por um conjunto de linhas relativamente estreitas nas frequências de deslocamento químico isotrópico como em um espectro de RMN de solução de onda a composição química da amostra. No entanto, deve-se ressaltar que, mesmo sob MAS de desacoplamento simultâneos, as linhas de RMN de sólidos de materiais desordenados são muito mais largas do que em solução. Isso ocorre principalmente porque os deslocamentos químicos isotrópicos também são sensíveis a conformação local das moléculas, produzindo um alargamento residual das linhas. Esse alargamento residual associado a complexidade química da amostra, faz

com que os espectros de matéria orgânica natural sejam muito complexos e nem sempre é possível inferir detalhes sobre a composição a química.

**Polarização Cruzada (CP):** Mesmo usando técnicas como MAS e desacoplamento heteronuclear ainda é experimentalmente difícil obter espectros de amostras sólidas para núcleos raros (baixa abundância natural) e com pequenas razões giromagnéticas, como  $^{13}\text{C}$ . A baixa sensibilidade está associada ao fraco sinal de RMN já que somente 1% dos carbonos da amostra são  $^{13}\text{C}$  e portanto detectável por RMN. Assim, a necessidade do acúmulo de milhares de espectros para melhorar a relação sinal-ruído e os longos tempos de relaxação spin-rede ( $T_1$ ) resulta em tempos experimentais muito longos. Para contornar esses problemas o método polarização cruzada foi proposto por Pines e colaboradores (Baldus2005). Este método é baseado na transferência de magnetização entre os spins de  $^1\text{H}$ , abundantes e com  $T_1$  mais curto, dipolarmente acoplados aos raros núcleos de  $^{13}\text{C}$ . Após esta transferência de magnetização, o sinal dos núcleos raros é aumentado por um fator  $\gamma_{abundante} \gamma_{raro}$  (fator igual a 4 para  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) quando comparado com o excitação com um único pulso de  $\frac{\pi}{2}$  (denominado polarização direta — DP ou *Single Pulse Excitation* - SPE). Outra vantagem a excitação via polarização cruzada é que apesar do experimento ser realizado para os núcleos  $^{13}\text{C}$ , a taxa de repetição para a média do sinal é determinada pelo  $T_1$  dos  $^1\text{H}$ . Isso é de fato, a principal fonte do ganho de sensibilidade devido à excitação via CP já que tipicamente os valores de  $T_1$  dos  $^1\text{H}$  é cerca de 10 vezes mais curtos que os de  $^{13}\text{C}$ . Assim, no mesmo tempo experimental é possível realizar dez vezes mais aquisições, o que juntamente com o ganho de intensidade de 4, torna a excitação dos  $^{13}\text{C}$  via CP cerca de 40 vezes mais eficiente do que excitação via DP.

Utilizando a combinação de polarização cruzada, desacoplamento heteronuclear de  $^1\text{H}$  e rotação em torno do ângulo mágico, técnica conhecida como CP-DECMAS, pode-se obter espectros de  $^{13}\text{C}$  em tempo razoável de onde pode-se observar os deslocamentos químicos individualizados de modo a obter informação sobre a composição química das amostras. Na Figura 2a está mostrado o esquema usualmente utilizado para representar a sequencia de pulsos de RF no experimentos de CP-DECMAS. O experimento corresponde basicamente de i) aplicação de um pulsos de  $\pi/2$  nos  $^1\text{H}$  (indicado como o retângulo preto na figura), irradiação simultânea dos dois núcleos para produzir a transferência de magnetização  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (indicado com CP) e irradiação do núcleo de  $^1\text{H}$  para promover o desacoplamento heteronuclear com simultânea aquisição do  $^{13}\text{C}$ . Nas figuras 2b, 2c e 2d está ilustrado o ganho em resolução espectral obtido com cada uma das técnicas que constituem o experimento CP-DECMAS. Na figura 2b está ilustrado um espectro típico de uma amostra de Glicina obtido somente com a técnica de polarização cruzada. Como a interação dipolar  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  está presente, observa-se somente uma banda larga sem qualquer discriminação dos deslocamentos químicos de cada grupo químico da glicina. Na figura 2c está ilustrado um espectro típico de uma amostra de Glicina obtido com a combinação das técnicas de polarização cruzada

e desacoplamento heteronuclear. Neste caso observa-se padrões alargados devido a anisotropia de deslocamento químico, porém já são observado os sinais individuais de cada grupo químico. Na figura 2d está ilustrado um espectro típico de uma amostra de Glicina obtido com a combinação das técnicas de polarização cruzada, desacoplamento heteronuclear e MAS. Neste caso observa-se linhas estreitas associadas ao deslocamento químico isotrópico de cada grupo químico.

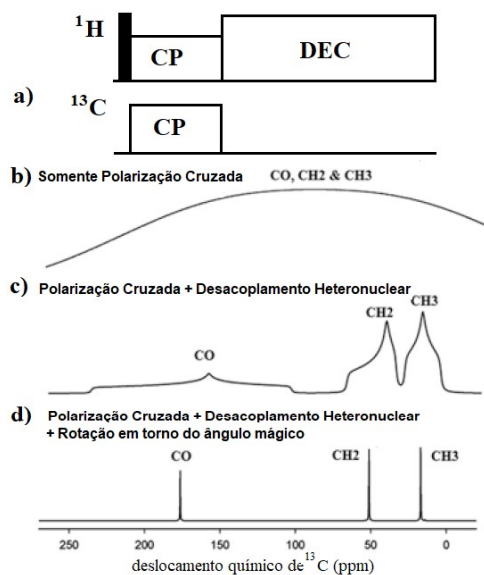


Figura 1 – Diagrama da sequência de pulsos.  
Fonte: gerada pelo autor

Os retângulos representam os pulsos de RF utilizados no experimento. O retângulo cheio corresponde a um pulso de  $\pi/2$ . b) Espectro de  $^{13}\text{C}$  esperado para uma amostra de Glicina ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ ) obtido somente com a técnica de polarização cruzada. c) Espectro de  $^{13}\text{C}$  esperado para uma amostra de Glicina obtido com a combinação das técnicas de polarização cruzada e desacoplamento heteronuclear. d) Espectro de  $^{13}\text{C}$  esperado para uma amostra de Glicina obtido com a técnica CP-DECMAS, ou seja, combinação das técnicas de polarização cruzada, desacoplamento heteronuclear e rotação da amostra em torno do ângulo mágico.

### 3 Metodologia

#### 3.1 A colônia de formigas

Atuando como herbívoros generalistas, formigas cortadeiras (gêneros *Acromyrmex* e *Atta*), em particular cortam folhas, pétalas e frutas, que utilizam para o cultivo de *Leucoagaricus gongylophorus*, fungo altamente domesticado que aparentemente se adapta à composição e recalitrância do substrato, mas podendo ter também *Rhizopus oryzae* (Marques,2024).

Jardins de fungo e lixo de diferentes atíneas foram coletadas no Parque Estadual Serra do Mar, Núcleo Picinguaba (S23° 21' W44°49'), no município de Ubatuba-SP, no período de 18/04/2023 a 22/04/2023 pela pesquisadora colaboradora Mariana Barcoto do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) no Centro de Estudos de Insetos Sociais/UNESP-Rio Claro, que cuidou de todo o preparo das amostras e introdução das dietas.



Figura 2 – Segmentações da Colônia

Fragmentos de jardim de fungo e lixo foram coletados de modo asséptico, sendo mantidos em recipientes esterilizados até o processamento (Rodrigues et al., 2009). Em ocasiões em que as diferentes porções do jardim eram evidentes, as amostras foram separadas em: i) topo do jardim; ii) base do jardim; e iii) lixo e quando o objetivo era exclusivamente analisar as dietas, as amostras foram separadas em: i) topo do jardim; iii) meio do jardim; iii) base do jardim; e iv) lixo (figura 2), sendo que em ambos operárias, larvas e pupas foram removidas com auxílio de pinça entomológica.

### 3.1.1 Introdução das dietas

Colônias foram designadas aleatoriamente a quatro tipos de dietas i) Controle, onde folhas, frutas e cereais foram oferecidas de modo intermitente ao longo de 55 dias; ii) Folhas secas e frescas, contendo substratos vegetais mais recalcitrantes oferecidos ao longo de 55 dias; iii) Frutas e cereais, contendo fontes menos recalcitrantes de polissacarídeos vegetais, oferecidas ao longo de 55 dias; iv) Alternada, onde a dieta de folhas foi oferecida por 20 dias, sendo alternada com a dieta de frutas e cereais (oferecida por 20 dias), retornando à dieta de folhas pelos últimos 15 dias de experimento.

Na dieta rica em folhas frescas e secas, as formigas coletam espécies como *Citrus aurantium* (laranjeira seca), *Eucalyptus globulus* (eucalipto seco), *Hibiscus sp.* (folha fresca) e *Morus alba* (amora miura, tanto fresca quanto seca). Essas folhas servem como fonte de nutrientes para os fungos simbiotes, que as decompõem e transformam em alimentos acessíveis para a colônia. As folhas frescas oferecem mais umidade e compostos voláteis, enquanto as folhas secas são ricas em fibras estruturais.

A dieta rica em frutas inclui alimentos como *Avena sativa* (aveia em flocos), *Carica papaya* (mamão desidratado), *Malus domestica* (maçã desidratada), *Mangifera indica* (manga desidratada), *Musa spp.* (banana desidratada), *Oryza sativa* (arroz integral), e *Psidium guajava* (goiaba desidratada). Essas frutas são ricas em carboidratos e açúcares, nutrientes que os fungos simbiotes conseguem decompor de maneira mais rápida, proporcionando uma fonte de energia eficiente para as formigas. Essa dieta é especialmente importante para ambientes onde há abundância de

frutas, permitindo uma digestão mais ágil e um fluxo de nutrientes constante para a colônia.

No grupo controle, as formigas têm acesso a uma mistura de plantas e frutas comumente encontradas nos biomas onde essas formigas habitam. A dieta controle inclui *Citrus aurantium*, *Eucalyptus globulus*, *Hibiscus sp.*, *Malus domestica*, *Mangifera indica*, *Morus alba*, *Musa spp.*, e *Syzygium jambolanum*, que são plantas e frutas que as formigas encontram naturalmente em seus ecossistemas. Esse tipo de dieta reflete a diversidade alimentar disponível nesses ambientes, equilibrando folhas e frutos, tanto frescos quanto desidratados

Fragmentos do topo, meio e base do jardim de fungo (aproximadamente 2g) e a totalidade do lixo foram amostrados em quatro pontos experimentais: o primeiro dia do experimento (T0); após 20 dias de experimento (T1); após 40 dias de experimento (T2); após 55 dias de experimento (T3). O intervalo entre os tempos amostrais diferiu em relação à proposta inicial, sendo necessário para permitir a recuperação das colônias após a amostragem. Cabe mencionar que o experimento foi idealizado para durar 60 dias, no entanto a deterioração dos 11 jardins submetidos à dieta de frutas e cereais (detalhes a seguir) exigiu que a amostragem final fosse realizada antecipadamente. Após cada amostragem, operárias, ovos, larvas e pupas foram removidas com auxílio de uma pinça entomológica, e fragmentos do topo, meio, base e lixo foram armazenados separadamente a -20 °C para análises, que foram conduzidas em um espectrômetro Bruker Avance 400, equipado com uma sonda Bruker 4-mm MAS de dupla ressonância, em frequências de 100.5 MHz e 400.0 MHz para <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H, respectivamente.

## 4 Resultados

### 4.1 Características gerais dos espectros de colônias de formigas

A figura 3 ilustra como espectros CPMAS obtidos por amostras de diferentes colônias de formigas podem ser, pois sinais com alto grau de superposição são identificáveis, algo tipicamente associado a sinais de materiais lignocelulósicos ou com proteínas e lipídios,

A distribuição desses sinais está indicada na Tabela 1 e pode ser observado quatro grupo de sinais associados a celulose (sinais indicados como 4,5,6,7,9), hemicelulose (1,3,6,8,11), lignina (sinal indicado com 10), lipídios e proteínas de tecido vegetal (sinal indicado com 1)

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas como formigas cortadeiras, são conhecidas por cortar partes verdes de plantas para cultivar fungos dentro de suas colônias. (Kost:2011) Esses fungos são alimentados com matéria orgânica fornecida pelas formigas e, em troca, fornecem nutrientes para as formigas (Nickle:2013). Isso pode explicar a maior concentração de carboidratos na parte superior das colônias (TOPO), pois é onde elas armazenam as folhas cortadas. Note que na figura

3A a região entre 0-50ppm apresenta um sinal de baixa intensidade quando comparada a região de sinais associada a celulose, entre 62.5 - 105ppm.

Número	Grupo químico	Posição (ppm)
0	Grupos alifáticos	10-50
1	CH3 em grupos acetyl de hemiceluloses	21.5
2	Carbonos metoxil arílicos da lignina	56.2
3	C6 da celulose não-cristalina, C6 das hemic., OCgH2 da lign.	62.5
4	Carbono C6 da celulose cristalina	64.8
5	C2,3,5 da celulose e hemiceluloses	74.4
6	C4 da celulose não-cristalina e hemic., OCbH2 da lign.	83.5
7	Carbono C4 da celulose cristalina	87.9
8	Ombro do carbono C1 das hemiceluloses	101.8
9	Carbono C1 da celulose	105.0
10	C2 de carbonos aromáticos na lignina	110-180
11	Grupos carboxila das hemiceluloses	173.6

Tabela 1 – Atribuições das linhas de RMN de 1 a 11 indicadas no espectro na Figura 14

Por outro lado, *Mycocepurus* e *Mycetophylax* são gêneros de formigas atineas inferiores e embora não haja muita informação disponível sobre a dieta e o comportamento desses gêneros específicos, sabe-se que as formigas atineas inferiores têm comportamentos alimentares diferentes das formigas atineas superiores. Em vez de cortar folhas, essas formigas geralmente coletam detritos vegetais para cultivar seus fungos nas partes mais profundas, sendo estes detritos partes mortas das plantas, de frutos e flores caídos no chão, fezes e carcaças de outros insetos (urrea2023). Portanto, faz sentido que a parte superior de suas colônias os sinais referentes a folhas sejam menores que os mesmo nas amostras de formigas cortadeiras na figura 3A, e ainda tenha uma maior concentração de proteínas e lipídios, pois a região entre 0-50ppm é característica de compostos alifáticos e tanto as proteínas quanto os lipídios podem conter partes alifáticas em suas estruturas, isso justifica o sinal nessa região da figura 3B ser diferente.

Podemos notar que o pico referente aos carbonos de celulose e hemicelulose em 74.4ppm então mais presentes no topo do que quando comparado ao mesmo espectro do meio, sendo maior que o de base, que por sua vez estão mais presentes ainda do que no espectro referente ao lixo, perceptível graças as linhas pretas estarem acima das linhas vermelhas e azuis nessa região, e ambas acima da linha verde. Essa relação é inversamente proporcional ao observado na região entre 20ppm e 40ppm, no qual o sinal do lixo é mais intenso que o da base, e estes mais intensos que o meio e topo, pois agora as linhas da curva verde estão acima das linhas vermelhas e azuis, e estas estão acima das linhas pretas nessa região. Vale citar que a região de carboxila em 173.6ppm não apresentou

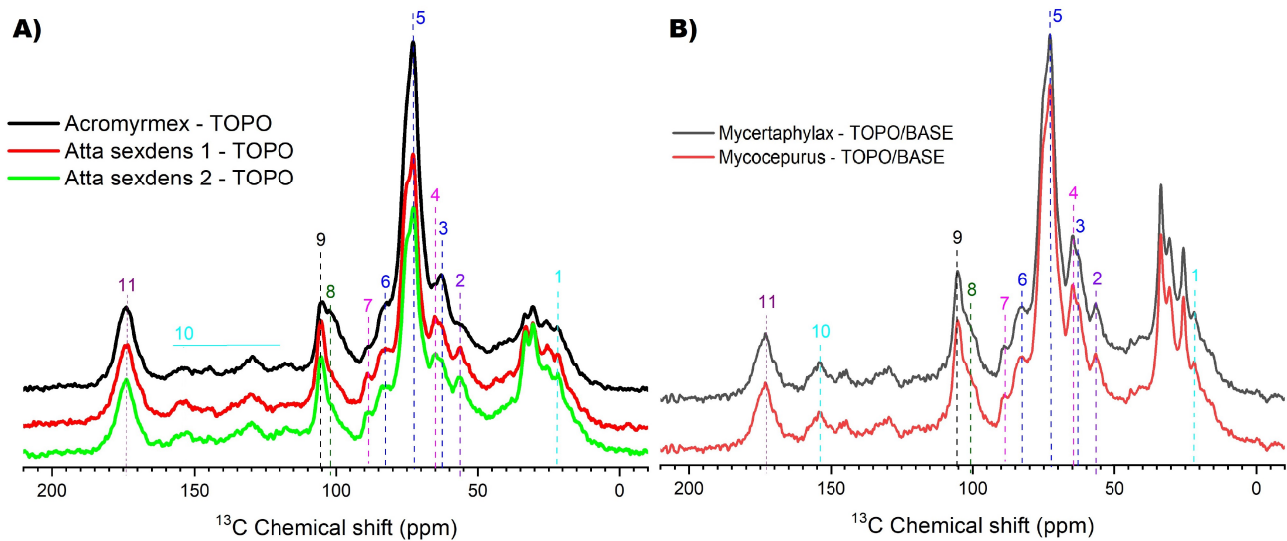


Figura 3 – Atribuição de sinais - A: Espectros normalizados pela área obtidos com a técnica de CP-MAS em amostras de diferentes colônias de formigas Atineas superiores, comparando o TOPO de cada uma delas. B: Espectros normalizados pela área obtidos com a técnica de CP-MAS em amostras de diferentes colônias de formigas Atineas inferiores, comparando o TOPO de cada uma delas.

grande degradação, visto que as linhas pretas, vermelhas e azuis estão sobrepostas nessa região, assim como na região entre 120ppm e 180ppm.

## 4.2 Variações associadas as secções da colônia

À medida que vamos para as partes mais profundas da colônia, onde uma variedade de matéria orgânica é consumido pelas formigas e seus fungos, a quantidade de compostos alifáticos tende a aumentar. Além de que resulta em uma distribuição diferente de nutrientes em suas colônias, com os sinais de carboidratos do Topo mais baixos que os do Lixo, o que pode ser observado na figura 4 com a região alifática entre 0-50ppm tendo a curva verde referente ao lixo como a mais alta das curvas, e na região de sinais associada a celulose, entre 62.5 - 105ppm observamos essa mesma curva como a mais baixa quando comparada as curvas referentes as outras secções. Podemos observar os pontos referentes a celulose e hemicelulose no topo e no lixo por exemplo, a quebra da celulose, hemicelulose e parte da pectina ocorre principalmente no final do processo de decomposição (Grell2013), que é representado pela seção inferior (ou “lixo”) do jardim de fungos. Portanto, é esperado que os sinais de celulose e hemicelulose sejam mais baixos nesta seção em

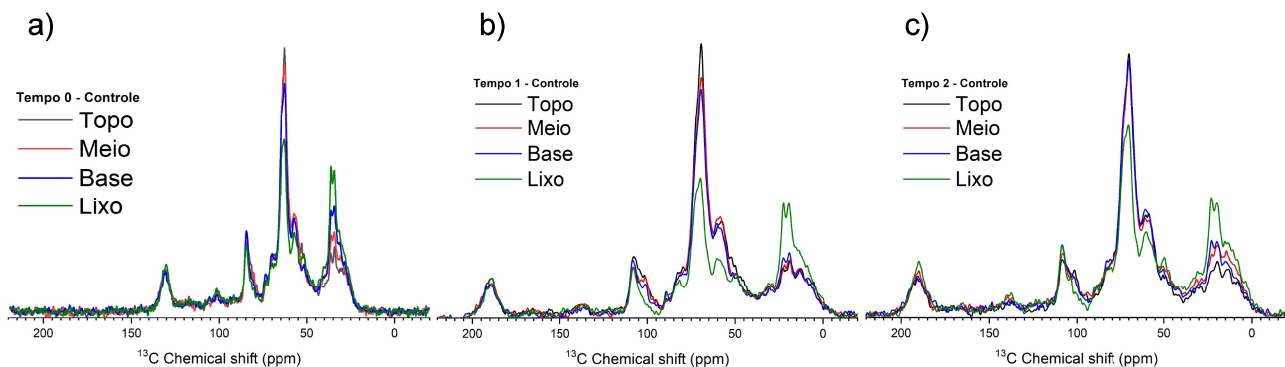


Figura 4 – Espectros obtidos com a técnica de CPMAS em amostras de colônias de formigas *At-tinea* em diferentes tempos

comparação com o topo do mesmo jardim de fungos, isso ocorre pelo processo de decomposição de materiais vegetais pelas formigas e seu simbionte fúngico.

O simbionte fúngico das formigas é capaz de degradar uma ampla gama desses polímeros vegetais. No entanto, a conversão, ou seja, a quebra da celulose, hemicelulose e parte da pectina ocorre principalmente no final do processo de decomposição (Grell2013). Isso significa que esses polímeros são quebrados em componentes menores que podem ser utilizados pelas formigas principalmente na seção inferior do jardim de fungos.

As colônias que estamos observando cultivam fungos que pertencem à família Lepiotaceae em seus ninhos, que podem produzir enzimas capazes de quebrar polímeros vegetais que as formigas não conseguem digerir, e transformam as folhas e gramíneas cortadas pelas formigas em nutrientes disponíveis para as formigas quando elas se alimentam do fungo cultivado (Tsang2017).

Como esse padrão descrito ocorre para todos os tempos, pois as figuras 4B (com 20 dias de experimento) e 4C (com 40 dias de experimento) apresentam o mesmo padrão descrito na figura 4A (logo no primeiro dia da introdução das dietas), o próximo passo foi investigar se esses padrões se mantêm ou se alteram nas dietas com folhas, frutas e na dieta alternada entre folhas e frutos, tendo em vista que não se observa mudanças significativas em função do tempo quando observamos a dieta natural das formigas.

### 4.3 Variações associadas a dieta

Nos espectros referentes à dieta rica em folhas, observamos que o padrão se mantém consistente. A região do topo da colônia apresenta a maior concentração de carboidratos, o que é coerente com o comportamento das formigas, já que é esperado que a parte superior da colônia acumule mais

folhas naturalmente como se observa na figura 5.

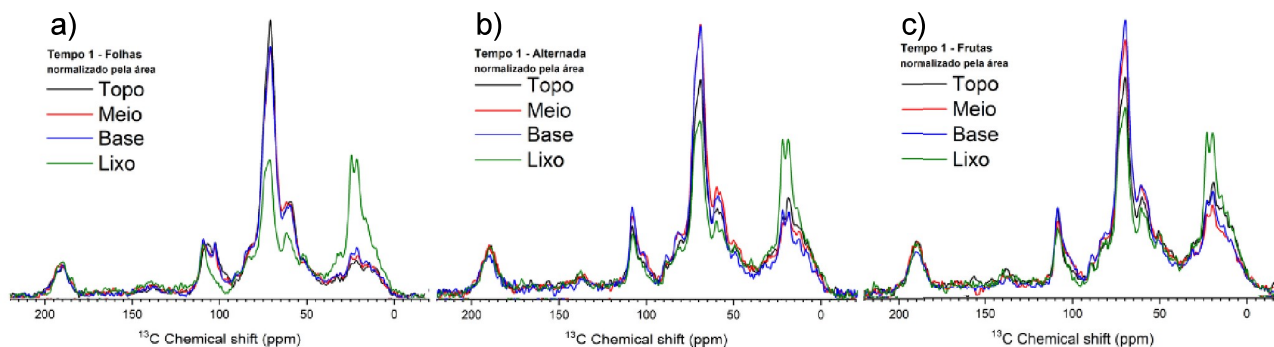


Figura 5 – Espectros obtidos com a técnica de CPMAS em amostras de colônias de formigas *At-tinea* após 20 dias sob dietas ricas em folhas e frutos.

Uma dieta ainda mais rica em folhas apenas reforça esse padrão. Na região alifática, notamos sinais que novamente indicam a quebra de celulose, hemicelulose e parte da pectina, processos que ocorrem predominantemente no final da decomposição. Esses sinais são mais intensos na seção inferior da colônia, conhecida como "lixo", seguidos pela base, meio e topo, refletindo a relação inversamente proporcional mencionada anteriormente.

Em relação à dieta rica em frutas, os sinais de carboidratos aparecem mais intensamente nas regiões da base e do meio da colônia. Isso pode ser explicado pela presença de sacarose e outros açúcares naturais das frutas. Na região alifática, mais uma vez, o sinal referente ao "lixo" é o mais intenso, devido ao avançado estágio de decomposição.

A dieta alternada mostra um padrão misto entre as duas anteriores. Há um aumento nos sinais tanto nas regiões do meio e da base, por conta da presença de frutas, quanto no topo, devido à maior quantidade de folhas. Essas diferenças tornam-se mais evidentes ao compararmos os espectros de todos os topos da figura 6, o que permite observar quais colônias exibem sinais mais altos em relação às demais.

Note que o espectro referente as frutas apresenta apenas um pico na região próxima aos 100ppm na figura 6B e 6C, enquanto os outros espectros, em especial da dieta rica em folhas, apresenta dois sinais distintos. Isso pode ser explicado pois hemiceluloses desempenham um papel estrutural mais significativo nas folhas, ajudando na rigidez da parede celular, junto com a celulose. Por isso, é esperado que o sinal do carbono C1 das hemiceluloses seja mais intenso em folhas. Embora hemiceluloses também estejam presentes nas paredes celulares das frutas, sua concentração tende a ser menor comparada às folhas, já que as frutas possuem uma composição mais rica em pectinas e açúcares para reter água e facilitar a textura macia (assim como as frutas usadas na dieta,

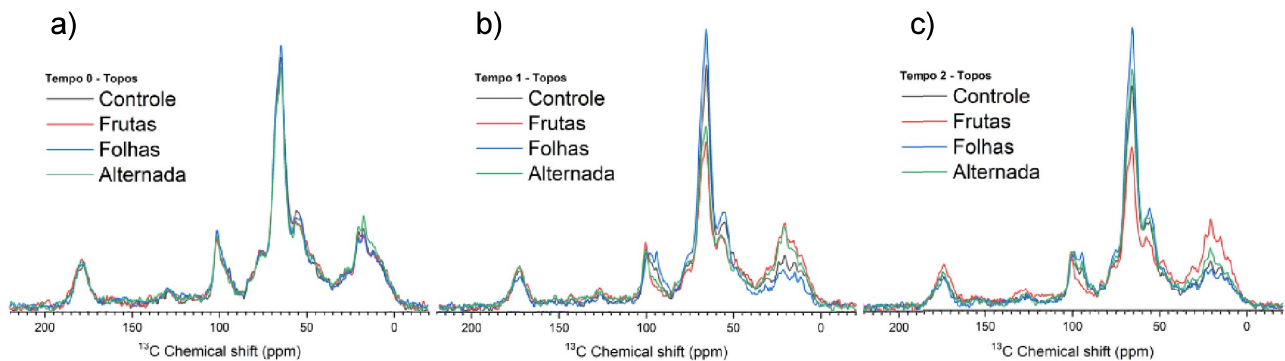


Figura 6 – Espectros obtidos com a técnica de CPMAS em amostras do topo de colônias de formigas *Attinea* entre 1 e 40 dias.

mamão, banana, manga e goiaba). Assim, o sinal do ombro do carbono C1 das hemiceluloses seria esperado, mas menos intenso do que em folhas, como indicam os gráficos tanto para 20 como para 40 dias de experimento.

Comparando o topo das amostras, fica claro que as dietas mais ricas em folhas apresentam sinais mais intensos na região correspondente aos carboidratos, em comparação com as outras dietas, confirmando as observações anteriores.

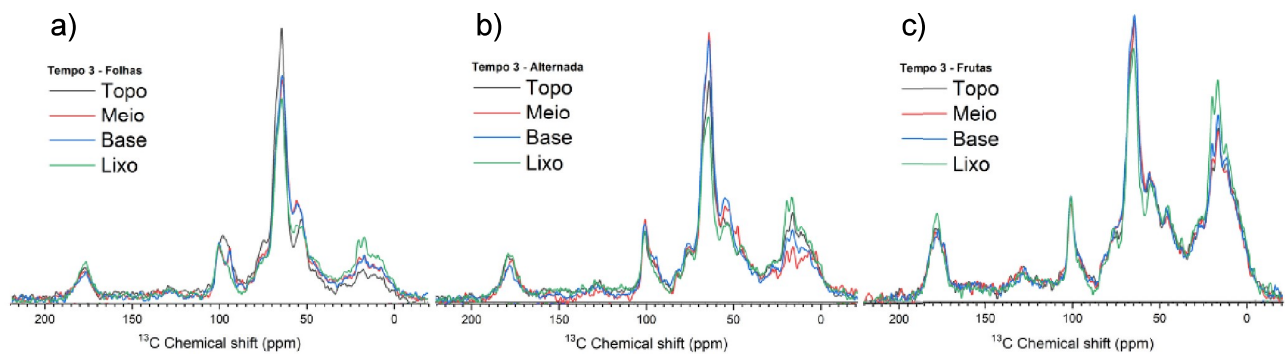


Figura 7 – Espectros obtidos com a técnica de CPMAS em amostras de colônias de formigas *Attinea* após 55 dias sob dietas ricas em folhas e frutos.

Mesmo após 55 dias de observação, os padrões das colônias permanecem os mesmos que nas amostras com 20 dias. As dietas ricas em folhas continuam apresentando maior concentração de carbono referente a celulose e hemicelulose nos topos como mostra a figura 7A, enquanto as dietas ricas em frutos mostram maior presença de carboidratos nas regiões do meio e da base, como pode

ser visto na figura 7C e explicada devido à presença de sacarose. Já na dieta alternada vista na figura 7B, observamos um padrão intermediário.

Na figura 8 comparamos os espectros de uma única dieta para três secções das colônias em função do tempo, e observamos que quase não há diferença entre esses espectros. Essa figura confirma nossas observações anteriores que para esse tipo de estudo submeter as formigas a 20 dias de dieta ou a 40 e 55 dias não apresenta diferenças significativas.

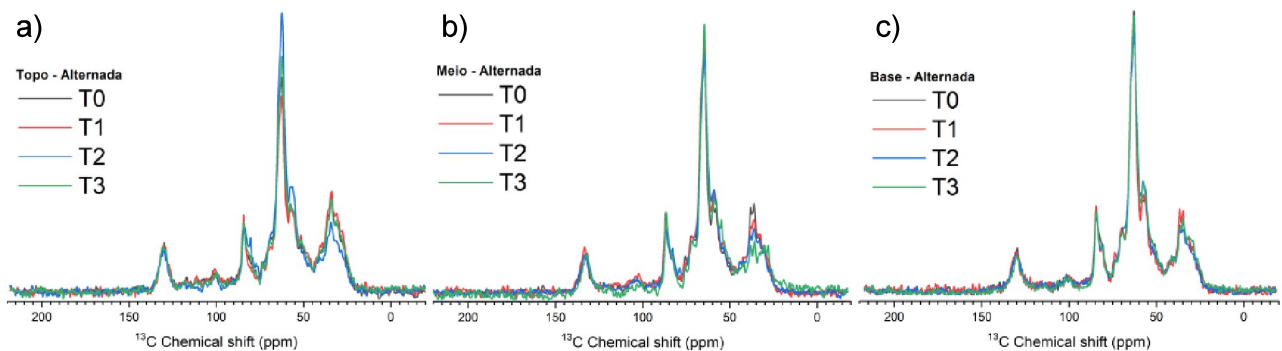


Figura 8 – Espectros obtidos com a tecnica de CPMAS em amostras do topo de colônias de formiga *Attinea* sob uma dieta alternada de frutas e folhas ao longo do tempo

## 5 Conclusões

Com base nas análises dos espectros, podemos concluir que a distribuição de compostos como celulose e hemicelulose nas colônias de formigas cortadeiras depende fortemente da dieta. A decomposição desses materiais segue um padrão claramente influenciado pela fonte alimentar, sendo maior a presença de polímeros estruturais em dietas ricas em folhas e maior acúmulo de açúcares em dietas ricas em frutas. Essa informação é crucial para entender como mudanças forçadas na dieta, como as provocadas por queimadas e alterações ambientais, podem impactar os processos de decomposição nas colônias, e conseqüentemente, na dinâmica ecológica do sistema formiga-fungo.

Se as formigas forem forçadas a consumir mais matéria vegetal queimada ou espécies vegetais com diferentes composições químicas, a dinâmica de decomposição dentro dos seus jardins de fungos também mudará. Caso as formigas tenham acesso apenas a plantas com menor concentração de celulose e hemicelulose (como plantas novas após a queimada ou espécies invasoras), as colônias podem ter dificuldade em manter a mesma eficiência de cultivo do fungo simbiote, que depende desses polímeros estruturais para sua nutrição. Se a dieta das formigas for composta por material parcialmente queimado ou carbonizado, isso pode alterar significativamente o processo de decomposição e a saúde do jardim de fungos.

A caracterização e análise dos espectros servem para mapear como diferentes dietas impactam a saúde do fungo simbionte e a eficiência do processo de decomposição nas colônias. Isso, por sua vez, é crucial para entender os impactos ecológicos das mudanças alimentares forçadas.

Ao identificar as dietas (frutas, folhas, controle, alternada) e como elas afetam as formigas e seus fungos simbiontes, podemos começar a entender quais tipos de alimentos contribuem mais para a estabilidade ecológica das colônias e quais são mais vulneráveis a alterações ambientais.

### Referências

- BROWN, R. W. et al. *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design* (2nd ed.). John Wiley e Sons, 2014. ISBN: 978-0-470-56895-5.
- KEELER, J. *Understanding NMR Spectroscopy* (2nd ed.). John Wiley e Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-74608-0.
- LEVITT, M. H. Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 40, 2002.
- GIUNTA, C. J.; MAINZ, V. V. *Discovery of Nuclear Magnetic Resonance: Rabi, Purcell, and Bloch. Pioneers of Magnetic Resonance*, 2020.
- ANDREW, E. R. et al. Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. *Nature*, v. 182, 1958.
- SARLES, L. R.; COTTS, R. M. Double nuclear magnetic resonance and the dipole interaction in solids. *Physical Review*, v. 111, 1958.
- NICKELE, M. A. et al. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte. *Pesq. Florestal Brasileira*, v. 33, 2013.
- CAMARGO, R. S. et al. The effect of plant diversity on fungus garden development. *Sociobiology*, v. 42, 2003.
- KOST, C. et al. Do Leaf Cutting Ants Cut Undetected?. *PLoS ONE*, v. 6, 2011.
- URREA-VALENCIA, S. et al. Unraveling fungal species cultivated by lower attine ants. *Mycol Progress*, v. 22, 2023.
- TSANG, J. *The Leaf-cutter Ant's 50 Million Years of Farming*. American Society for Microbiology, 2017.
- GRELL, M. N. et al. The fungal symbiont of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *BMC Genomics*, v. 14, 2013.
- CIPRIANO, D. F. et al. Aplicação da RMN de  $^{13}\text{C}$  no Estado Sólido ao Estudo dos Teores de Lignina. *Rev. Virtual Quim.*, v. 12, 2020.
- MARQUES, M.J.A.M. et al. Morphological aspects and the effectiveness of photodynamic inactivation against *Rhizopus oryzae* in different life cycles. *Photochem Photobiol Sci* 23 (2024).