

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

HUGO RODRIGO BARBOSA DA SILVA

**HIDROCARBONETOS CUTICULARES COMO INTERMEDIADORES DO
RECONHECIMENTO E COMPORTAMENTO SEXUAL DO ESCORPIÃO *Tityus
pusillus* (POCOCK, 1893)**

RECIFE

2021

HUGO RODRIGO BARBOSA DA SILVA

Hidrocarbonetos cuticulares como intermediadores do reconhecimento e comportamento sexual do escorpião *Tityus pusillus* (POCOCK, 1893)

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Linha de pesquisa: Ecologia

Orientador: Prof°. Dr. Artur Campos Dália Maia

Co-orientador: Prof°. Dr. Wendel José Teles Pontes

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Silva, Hugo Rodrigo Barbosa da
Hidrocarbonetos cuticulares como intermediadores do reconhecimento e comportamento sexual do escorpião *Tityus pusillus* (POCOCK, 1893) / Hugo Rodrigo Barbosa da Silva – 2021.

52 f.: il., fig., tab.

Orientador: Artur Campos Dália Maia
Coorientador: Wendel José Teles Pontes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Recife, 2021.
Inclui referências.

1. Escorpião 2. Comportamento sexual 3. Mata Atlântica I. Maia, Artur Campos Dália (orient.). II. Pontes, Wendel José Teles (coorient.) III. Título

595.5

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-304

HUGO RODRIGO BARBOSA DA SILVA

Hidrocarbonetos cuticulares como intermediadores do reconhecimento e comportamento sexual do escorpião *Tityus pusillus* (POCOCK, 1893)

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Data de aprovação: Recife – PE, _____ de _____ de _____.

Prof. Dr. Artur Campos Dália Maia (Orientador)

Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Wendel José Teles Pontes (Coorientador)

Universidade Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Débora Barbosa de Lima (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luciana Iannuzzi (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Felipe Cristaldo (Examinador externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

À meu falecido pai e à minha Mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me manter são, firme e forte para acreditar na minha capacidade e lutar pelos meus ideais. Agradeço a minha família, minha mãe por sempre me incentivar nos estudos e a ir fundo no que acredito e minha irmã por me mostrar que independente de tudo você deve crer em você mesmo e seguir em frente.

Agradeço ao meu orientador que aceitou fazer parte dessa jornada em busca de respostas para as perguntas em mundo de incertezas que são os escorpiões, ao meu coorientador por estar junto conosco nessa empreitada e me dar a oportunidade de fazer parte de uma equipe. Ambos me inspiram em seguir na carreira de pesquisador e acreditar na ciência, me abriram a mente para a ecologia química e me fizeram acreditar ainda mais na minha capacidade, obrigado pela confiança e espero ter suprido com as expectativas. Aos membros da banca examinadora que com certeza trouxeram críticas contrutivas para a melhoria deste trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA) que dividiram comigo desde os desgastes psicológicos de um mestrado, aos congressos fora do estado que tivemos a oportunidade de comparecer antes do início desta pandemia, me confortaram e apoiaram em momentos de agonia com relação a todas as vezes que eu fiquei fora do meu controle emocional, Carla seu abraço de conforto depois de uma explosão de choro minha em conjunto com um desabafo nunca será esquecido e André, sua parceria desde o momento que entrou para a equipe é louvável. Aos colegas de mestrado, especialmente a Michelly que esteve comigo em todos os momentos de desespero e dificuldade, onde ambos nos apoiávamos e incentivávamos a não desistir dos nossos sonhos.

Agradeço aos companheiros de coleta que pudemos compartilhar aprendizado, tiveram a experiência de fazer coleta noturna de escorpiões comigo e fazer de cada coleta experiências únicas em cada noite, obrigado pelos momentos de descontração. Obrigado por fazerem parte deste trabalho, sem o apoio de vocês não seria possível a realização desta pesquisa. Agradeço também ao CIMNIC em especial a Tenente Elizabeth que mediou todo o contato e possibilitou nossa estadia nos meses de coletas.

Aos meus amigos desde o tempo de escola que sempre me apoiam pelos caminhos que escolho trilhar e sempre se fazem presente quando preciso na medida do possível. Aos meus amigos de faculdade que sempre compartilham comigo suas experiências e me fazem acreditar em um futuro onde a pesquisa e a ciência não de ser mais valorizadas em nosso país, obrigado por me inspirar com seus símbolos de força e resistência.

Agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) tem como principal função o controle da perda de água do corpo para o ambiente e mostram-se como importante fator na dinâmica comportamental de muitas espécies de artrópodes, influenciando o reconhecimento sexual. Uma vez que há uma corte realizada que envolve contato direto entre o macho e a fêmea de *Tityus pusillus* e que machos tem apresentado modificação comportamental pré-copulatória em substratos sobre os quais fêmeas estiveram, levantou-se a hipótese que o reconhecimento sexual possa ser mediado por HCs. Esta dissertação teve como objetivo conhecer a composição dos HCs característicos à espécie de escorpião *T. pusillus* e observar sua influência no reconhecimento intraspecífico, além do efeito de compostos químicos liberados no substrato pelas fêmeas no comportamento sexual dos machos coespecíficos. Para conhecer a composição dos HCs, foram analisados os extratos cuticulares de fêmeas e machos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Afim de verificar os efeitos dos HCs sobre o comportamento sexual, foram realizados experimentos em arenas circulares (placas de petri forradas com papel de filtro), nas quais foram analisados os comportamentos de machos focais expostos à presença de fêmeas inertes (mortas por congelamento rápido) em duas situações: i) arena forrada com papel de filtro previamente ocupada por fêmeas coespecíficas durante 24hrs; ii) arena forrada com papel de filtro limpo. Além disso observou-se o comportamento de um macho focal frente machos e fêmeas cujos HCs foram removidos após lavagem com hexano. A composição dos hidrocarbonetos cuticulares de fêmeas e machos mostrou diferenças pontuais em sua constituição geral, sendo principalmente caracterizada por uma série contínua de alcanos lineares (C24 – C33; > 65% total relativo nas amostras), além de ácidos graxos e aldeídos lineares saturados. Em amostras de fêmeas, caracterizaram-se adicionalmente 2 – 6 picos cromatógraficos cujos espectros de massa foram preliminarmente atribuídos a derivados de esterol. Os machos de *T. pusillus* mostraram-se estimulados sexualmente quando em contato com o substrato previamente ocupado por fêmeas coespecíficas, realizando comportamentos sexuais com as fêmeas inertes. Eles também demonstraram seu interesse sexual por fêmeas coespecíficas lavadas em hexano (sem HCs), mas predominantemente ignoraram a presença de machos lavados. Nossos resultados demonstram que o reconhecimento coespecífico por parte

dos machos de *T. pusillus* não parece ser mediado por semioquímicos HCs, mas que pistas químicas deixadas no substrato por fêmeas da espécie podem atuar como afrodisíacos. Hipotetiza-se que esta função pode estar associada aos derivados de esterol exclusivos às lavagens cuticulares de fêmeas de *T. pusillus*, que por isso devem ser investigados com maior detalhe.

Palavras chave: cópula; comportamento de corte; floresta atlântica; feromônios sexuais.

ABSTRACT

The principal function of the Cuticular hydrocarbons (HCs) is control body loss water, but also they are an important factor in the behavioral dynamics of many arthropod species, as they influence sexual recognition. There is a courtship performed that involves direct contact between the male and female of *Tityus pusillus* and males presented precopulatory behavioral modification on substrates on which females were, we have a hypothesis that sexual recognition is mediated by HCs. This dissertation aimed to know the composition of the HCs characteristic of the scorpion specie *T. pusillus* and observe its influence on intraspecific recognition, in addition to the effect of chemical compounds released on the substrate by females on the sexual behavior of conspecific males. To know the composition of the HCs, the cuticular extracts of females and males were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). To observe the influence of HCs on sexual behavior, experiments were performed in circular arenas (petri dishes lined with filter paper), in which the behaviors of focal males exposed to the presence of inert females (killed by freezing) were performed in two situations: i) arena lined with filter paper previously occupied by conspecific females during 24hrs; ii) arena lined with clean filter paper. In addition, the behavior of a focal male front of males and females whose HCs were removed after washing with hexane was observed. The general constitution composition of cuticular hydrocarbons of females and males shows some differences, being mainly characterized by a continuous series of linear alkanes (C₂₄ - C₃₃; > 65% total relative in the samples), fatty acids and saturated linear aldehydes were components of the hydrocarbons extracted. In female samples, 2 – 6 chromatographic peaks whose mass spectra were preliminary attributed to sterol derivatives were additionally characterized. The males of *T. pusillus* were sexually stimulated when in contact with the substrate previously occupied by conspecific females, performing sexual behaviors when in contact with inert females. They also demonstrated their sexual interest in conspecific females washed in hexane (without HCs), but predominantly ignored the presence of washed males. Our results shows that the conspecific recognition by *T. pusillus* males does not seem to be mediated by semiochemicals HCs, but chemical cues left on the substrate by females of the specie may act as aphrodisiacs. This function may be associated with sterol derivatives

exclusive to cuticular washes of *T. pusillus* females, which therefore should be investigated in greater detail.

Keywords: copulation; courtship behavior; atlantic forest; sexual fheromones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – (A) Comparação das frequências dos ranques comportamentais de pré-toque, entre o grupo controle e o grupo experimental realizados por machos de *Tityus pusillus*. (B) Comparação das frequências dos ranques comportamentais de pós-toque, entre o grupo controle e o grupo experimental realizados por machos de *T. pusillus*.....34
- Figura 2** – (A) Média e erro padrão de toques que o macho focal realizou nas fêmeas inertes em substrato sem e com seus vestígios químicos. (B) Média e erro padrão de vezes que o macho focal segurou as fêmeas inertes em substrato sem e com seus vestígios químicos. (C) Média de tempo que o macho focal passou segurando as fêmeas inertes em substrato sem e com seus vestígios químicos.....35
- Figura 3** – Comparação das frequências dos ranques comportamentais de pós-toque, entre fêmeas e machos lavados com hexano e metanol, realizados por machos de *Tityus pusillus*.....37
- Figura 4** – (A) Média e erro padrão de toques que o macho focal realizou nos indivíduos lavados com hexano e metanol. (B) Média e erro padrão de vezes que o macho focal segurou os indivíduos lavados com hexano e metanol. (C) Média de tempo que o macho focal passou segurando os indivíduos lavados com hexano e metanol.....38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Rankings dos comportamentos pré-toque e pós-toque realizados por machos de *Tityus pusillus* em arenas com e sem a presença de vestígios químicos.....27
- Tabela 2** – Rankings dos comportamentos realizados por machos de *Tityus pusillus* frente a machos e fêmeas lavados com hexano e metanol.....28
- Tabela 3** – Perfil dos hidrocarbonetos cuticulares de *Tityus pusillus* obtidos por imersão em hexano.....32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	SÍNTESE E ECOLOGIA DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES.....	16
2.2	HIDROCARBONETOS CUTICULARES NOS ESCORPIÕES.....	19
2.3	RECONHECIMENTO SEXUAL E CÓPULA EM ESCORPIÕES.....	20
2.4	ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE DE ESCORPIÃO <i>Tityus pusillus</i> POCOCK, 1893.....	22
3	MÉTODO.....	25
3.1	COLETA E MANUTENÇÃO.....	25
3.2	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HCs.....	25
3.3	RECONHECIMENTO SEXUAL COM FÊMEAS INERTES E PRESENÇA DE RASTROS QUÍMICOS.....	26
3.4	RECONHECIMENTO SEXUAL SEM HCs.....	28
3.5	ANÁLISE DE DADOS.....	29
4	RESULTADOS.....	31
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS DE CUTÍCULA.....	31
4.2	RECONHECIMENTO SEXUAL COM FÊMEAS INERTES E PRESENÇA DE RASTROS QUÍMICOS.....	33
4.3	RECONHECIMENTO SEXUAL SEM HCs.....	36
5	DISCUSSÃO.....	39
6	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento entre indivíduos de uma mesma espécie é muitas vezes um fator determinante na dinâmica comportamental dos aracnídeos, tendo influência desde as interações intrasexuais até as intersexuais, como por exemplo o reconhecimento do parceiro (MILLER & FORMANOWICZ, 2011; WILLEMART & HEBETS, 2012; CERVEIRA & JACKSON, 2013; FERNANDES et al., 2017).

Em aracnídeos, especialmente aqueles da ordem Araneae, os registros de reconhecimento sexual através de pistas ou sinais químicos são mais frequentes (BARUFFALDI & COSTA, 2010; ELIAS et al., 2004; ELIAS et al., 2010; STAFSTROM & HEBETS, 2013). Na ordem Scorpiones, estímulos mecânicos vibratórios parecem desempenhar papel mais importante no comportamento sexual (BROWNELL, 2001; TAYLOR et al., 2012), mas semioquímicos com função clara no comportamento de corte já foram reportados (GAFFIN & BROWNELL, 1992; LIRA et al., 2018). Neste aracnídeos, o comportamento de cópula é relatado para várias espécies e seguem um padrão com algumas mudanças pontuais, com todas as descrições comportamentais de cópula adequadas à premissa do macho encontrar a fêmea randomicamente ou ativamente através da percepção mecânica (ALEXANDER, 1959; POLIS & FARLEY, 1979; BENTON, 1993; BRICEÑO & BONILLA, 2009).

Compostos lipofílicos presentes na cutícula dos escorpiões, os hidrocarbonetos cuticulares (HCs), podem apresentar a função tanto de feromônios quanto de cairomônios, auxiliando o reconhecimento de indivíduos coespecíficos (GAFFIN & BROWNELL, 1992; BLOMQUIST & BAFNÈRES, 2010). Os HCs em conjunto com os lipídeos cuticulares apresentam algumas funcionalidades, principalmente na tolerância à dessecação, além de ter relação direta na alimentação, comportamento e comunicação química (HADLEY & HALL, 1980; HALL & HADLEY, 1982; SPIEGEL et al., 2016). Machos da espécie de escorpião *Tityus pusillus* Pocock, 1893, quando entram em contato com pistas químicas oriundas das fêmeas, locomovem-se lentamente, realizando “Backstep” e “Juddering” que são interpretadas como comportamentos de pré-corte (PORDEUS et al., 2019).

Tityus pusillus apresenta ampla distribuição na região Nordeste do Brasil, representando 90% da fauna escorpiônica da Mata Atlântica (LOURENÇO, 2002; DIAS et al., 2006). O registro de seu comportamento de cópula foi documentado por LIRA et al. (2018), observaram que geralmente a corte se inicia com o encontro da fêmea pelo macho. Não se sabe, contudo, exatamente quais são os mecanismos que auxiliam o encontro entre os parceiros, além de não se ter conhecimento da composição dos compostos que possivelmente podem estar envolvidos no reconhecimento sexual da espécie.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Observar o papel dos hidrocarbonetos cuticulares (HCs) no reconhecimento e comportamento sexual da espécie de escorpião *Tityus pusillus*.

1.1.2 Objetivos específicos

- I. Identificar os componentes de extratos cuticulares de machos e fêmeas de *T. pusillus* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).
- II. Testar se a movimentação e reação comportamental da fêmea diante da investida do macho é fator determinante no reconhecimento sexual, através de ensaios comportamentais;
- III. Testar experimentalmente a influência das pistas químicas deixadas pelas fêmeas no substrato sobre o comportamento de corte de machos frente a fêmeas inertes;
- IV. Testar a influência dos HCs no reconhecimento e comportamento sexual dos machos, por meio de ensaios comportamentais;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SÍNTESE E ECOLOGIA DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES

Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são uma mistura complexa de compostos com cadeias de carbono lineares, ramificadas e componentes insaturados, com os tamanhos das cadeias variando entre 21 a 50 carbonos, presentes na cutícula de insetos e aracnídeos (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010; POLIS, 1990). Os HCs podem ser divididos nas classes dos n-alcanos, hidrocarbonetos insaturados e alcanos metil-ramificados (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010). Os n-alcanos variam em comprimento de cadeias entre 21 a 33 carbonos e são comumente encontrados na cutícula dos insetos (NELSON et al., 2002; FLETCHER et al., 2008). Os hidrocarbonetos insaturados (alcenos e alcadienos) são frequentemente componentes feromonais, que podem por exemplo, auxiliar na identificação e evitar agressão dos companheiros de ninhos nas formigas *Formica exsecta* Nylander, 1846 (Hymenoptera, Formicidae) (MARTIN et al., 2008). Já os alcanos metil-ramificados, possuem um grupo metil nas posições de C2 a C5 e apesar de também serem comuns e abundantes entre os insetos, ainda não se sabe sua funcionalidade (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010).

Os insetos sintetizam a maioria dos seus HCs (NELSON & BLOMQUIST, 1995). Sua síntese acontece nos oenócitos, células que estão associadas a células epidérmicas ou dentro do corpo adiposo periférico e são transportados pela lipoproteína lipoforina através da hemolinfa e posteriormente incorporados na cutícula (HOWARD & BLOMQUIST, 2005). O processo biomolecular da síntese dos HCs se resume através do alongamento de lipídeos pela Acil-CoA, gerando ácidos graxos de cadeias longas, posteriormente convertidos em hidrocarbonetos através da perda de um grupo carboxila (NELSON & BLOMQUIST, 1995; HOWARD & BLOMQUIST, 2005). A taxa metabólica da atividade de síntese dos lipídeos e hidrocarbonetos dos insetos se mostra aproximadamente 10 vezes maior que nos aracnídeos (HALL & HADLEY, 1982).

Quando não são sintetizados, os HCs podem ser obtidos via dieta. Os n-alcanos de cadeia simples do grilo *Melanoplus sanguinipes* (Fabricius, 1798) (Orthoptera, Acridididae) são adquiridos via alimentação, transportados e incorporados para a cutícula, com exceção dos n-alcanos ramificados, álcoois secundários e cetonas (BLOMQUIST & JACKSON, 1972). O estágio de desenvolvimento do organismo também pode afetar a produção dos HCs. Um exemplo disto já foi observado na mariposa *Spodoptera eridania* Stoll, 1781 (Lepidoptera, Noctuidae) onde a incorporação dos hidrocarbonetos na cutícula durante as fases juvenis é maior nos períodos de intermuda larvais do que na fase adulta. A atividade de incorporação continua, porém com taxas menores, possivelmente através dos hidrocarbonetos armazenados em sítios de deposição durante o estado de pupa (GUO & BLOMQUIST, 1991).

Os HCs estão intrinsecamente ligados ao genótipo/fenótipo dos insetos e vêm sendo utilizados em estudos filogenéticos auxiliando no entendimento do processo de especiação (CHUNG & CARROLL et al., 2015), taxonomia (WATSON et al., 1989), além de estudos biogeográficos (THORNE et al., 1994). Por exemplo, os perfis de HCs da espécie de vespa *Polistes dominulus* (Christ, 1791) (Hymenoptera, Vespidae) foram utilizados como ferramenta para mostrar que as populações encontradas na costa da Itália são próximas das encontradas em duas das sete ilhas do arquipélago toscano, enquanto que a população de uma das ilhas (Capraia) é agrupada com a população da ilha da Córsega situada mais distante da costa italiana, reforçando a hipótese da separação das ilhas da costa da Itália (DAPPORTO et al., 2004). Os HCs femininos podem desempenhar papel de feromônios utilizados para atração do macho e funcionam como um mecanismo de isolamento reprodutivo entre duas espécies simpátricas e intimamente relacionadas de *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae), indicando que os machos respondem substancialmente aos feromônios de fêmeas coespecíficas (SHAHANDEH et al., 2018).

A presença de lipídeos e HCs no exoesqueleto de invertebrados terrestres funciona especialmente para reduzir a transpiração, aumentando a tolerância à dessecação (HADLEY & JACKSON, 1977). Um estudo realizado com *Tibicen dealbatus* Davis, 1915 (Homoptera, Cicadaceae), demonstrou que após 3 h de exposição às condições ambientais de 25 °C de temperatura e umidade a 10%,

indivíduos vivos perdem mais água do corpo para o ambiente que os indivíduos mortos. Porém, quando os indivíduos mortos tiveram seus HCs lavados com hexano, a perda de água se mostrou 79% maior que nos indivíduos mortos com HCs intactos (TOOLSON, 1984). A diferença de composição dos HCs influencia também o padrão de distribuição a partir da capacidade de tolerância à dessecação. Enquanto formigas da espécie *Solenopsis richteri* Forel, 1909 (Hymenoptera, Formicidae) apresentam cadeias curtas de carbono na composição de seus HCs e menor ponto de fusão, vivem em ambientes de maior altitude com temperatura mais baixas, a espécie congênera *Solenopsis invicta* Buren, 1972 possuem cadeias longas de carbono em seus HCs, tendo seu ponto de fusão mais alto e conseqüentemente maior tolerância à perda de água, vivendo em ambientes mais quentes e de menor altitude (XU et al., 2018).

Uma das funções dos HCs encontra-se nas relações ecológicas, sejam intra ou interespecíficas. Os HCs podem fornecer informações sobre identidade sexual (LIMA et al., 2001), idade (VANÍČKOVÁ et al., 2012), posição social na colônia (PASK et al., 2017) ou afetar o comportamento sexual (ZHANG et al., 2014). Um papel importante dos HCs na manutenção de uma colônia de insetos sociais é no controle da reprodução das operárias. Os ovos postos pela rainha da espécie de formigas *Camponotus floridanus* (Buckley, 1866) (Hymenoptera, Formicidae) sinalizam às operárias de sua presença no ninho através da composição de seus HCs. Como consequência, os ovos da rainha inibem a reprodução das operárias e as induzem a eliminarem seus próprios ovos (ENDLER et al., 2004). A quantidade de determinados HCs podem ser também características à idade larval. Na mosca *Chrysomya rufifacies* Macquart, 1842 (Diptera, Calliphoridae) foi detectado que a abundância de HCs de cadeia curta diminui com a idade larval (ZHU et al., 2006). Os HCs também podem afetar o comportamento sexual agindo como afrodisíacos. Na espécie de besouro *Phaedon cochleariae* Fabricius, 1792 (Coleoptera, Chrysomelidae) os HCs de machos e fêmeas são qualitativamente idênticos, porém com as proporções diferentes de seus componentes. No entanto, esta diferença quantitativa não apresenta relação com a capacidade de reconhecimento sexual por parte dos machos. O comportamento de cópula nesse caso é elicitado em indivíduos de ambos os sexos e mesmo quando expostos a modelos de vidro contendo extrato

de HCs tanto de machos quanto de fêmeas, os machos passam significativamente mais tempo acasalando com fêmeas vivas. O papel dos HCs nesta espécie pode então ser melhor definido como um desencadeador de cópula, e não um feromônio sexual (GEINSELHARDT et al., 2009).

2.2 HIDROCARBONETOS CUTICULARES NOS ESCORPIÕES

O processo de síntese dos HCs em escorpiões é descrito com maiores detalhes na espécie *Paruroctonus mesaensis* Williams, 1968 (Scorpiones, Vaejovidae). A grande maioria dos HCs nessa espécie são sintetizados durante a fase juvenil, sendo produzidos massivamente pelo hepatopâncreas e gradualmente incorporados à cutícula. Na fase adulta, a síntese se mostra reduzida sendo apenas realizada para a substituição dos hidrocarbonetos perdidos (HADLEY & HALL, 1980). Embora o hepatopâncreas seja o principal órgão produtor dos HCs em escorpiões, a incorporação de tais compostos à cutícula parece estar ligada à alimentação. Na espécie *P. mesaensis*, a incorporação dos HCs tem relação com a taxa de consumo alimentar, aumentando em média 10 dias após a ingestão de alimentos, principalmente através do transporte pela hemolinfa (HALL & HADLEY, 1982).

O tipo de dieta também pode afetar o perfil dos HCs em escorpiões. Em *P. mesaensis*, uma dieta à base de grilos da espécie *Trimerotropis pallidipennis* Burmeister, 1838 (Orthoptera, Acrididae) resultou em um perfil de HCs com maiores percentuais de n-alcenos e cadeias de hidrocarbonetos ramificados (C28, C29 e C30), quando comparados com escorpiões alimentados exclusivamente com grilos domésticos da espécie *Acheta domesticus* Linnaeus, 1758 (Orthoptera, Gryllidae) (HALL & HADLEY, 1982).

Em aracnídeos, os HCs podem apresentar mudanças significativas quanto à composição e quantidade, principalmente pelas propriedades antitranspirantes que conferem ao exoesqueleto, especialmente em espécies que habitam ambientes com grandes variações de temperatura. Nos períodos mais quentes (verão), os percentuais de HCs encontrados na cutícula de espécies de escorpião de áreas áridas, por exemplo, são maiores que no inverno (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010), o que sugere que a temperatura pode ser

um fator que influencia a produção dos HCs. Escorpiões da espécie *Buthus occinatus* Amoreux, 1789 (Scorpiones, Buthidae), quando expostos por duas semanas a temperaturas de 30 °C, além de baixo consumo de alimento e de água, apresentaram um aumento na quantidade de HCs, incluindo aumento de compostos de cadeias carbônicas mais longas (GEFEN *et al.*, 2015). O aumento da proporção de HCs de cadeias longas e/ou ramificadas na cutícula dos escorpiões *Centruroides sculpturatus* Ewing, 1928 (Scorpiones, Buthidae), durante o verão também é associada às adaptações contra a perda de água (TOOLSON & HADLEY, 1979). O contrário ocorre em duas espécies que têm seu período de maior atividade no inverno – *Urophonius achalensis* Abalos & Hominal, 1974 (Scorpiones, Bothriuridae) e *U. brachycentrus* Thorell, 1876 (Scorpiones, Bothriuridae) – que quando aclimatados a uma temperatura de 4 °C apresentaram maior quantidade de HCs em sua cutícula do que quando aclimatados a 20 °C (GARCIA *et al.*, 2021). Contudo, outras hipóteses não ambientais parecem explicar o aumento na síntese de HCs em escorpiões. O período de cópula dos escorpiões *Hadrurus arizonensis* (Williams, 1968) (Scorpiones, Caraboctonidae) e *S. mesaensis* ocorre no verão, quando as temperaturas estão mais altas e durante o qual eles apresentaram um maior percentual de HCs e diferenças em suas composições em comparação ao período de inverno (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010; GEFEN, 2008).

Diferenças na composição dos HCs em escorpiões e sua ocorrência durante o período reprodutivo sugerem que eles podem desempenhar um papel importante no reconhecimento sexual e individual e assim favorecer o reconhecimento de parceiros (GAFFIN & BROWNELL, 1992). Por exemplo, HCs presentes no extrato da cutícula de fêmeas na espécie *P. mesaensis*, induziram comportamento sexual de machos coespecíficos (GAFFIN & BROWNELL, 1992). Nas espécies de escorpiões *H. arizonensis* e *S. mesaensis*, o dimorfismo sexual quantitativo na composição de HCs é demonstrado quanto aos alcanos e componentes oxigenados, presentes em maior quantidade nas fêmeas e ésteres em maior quantidade nos machos (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010).

2.3 RECONHECIMENTO SEXUAL E CÓPULA EM ESCORPIÕES

Muitos dos comportamentos dos escorpiões são baseados em percepções mecânicas e de sinais químicos medeados pelos principais órgãos sensoriais, como os pentes, localizados na parte ventral do corpo e as cerdas cuticulares chamadas de tricobótrios, situadas nos pedipalpos e segmentos tarsais das pernas (GAFFIN & BROWNELL, 1997a,b; BROWNELL, 2001).

Há uma ampla variedade de compostos que podem ser utilizados como rastros químicos na procura por parceiros sexuais entre escorpiões. Os machos da espécie de escorpião de deserto *Centruroides vittatus* Digamos, 1821 (Scorpiones, Buthidae) identificam os compostos deixados pelas fêmeas no substrato porém não reagem a possíveis sinais químicos voláteis (STEINMETZ et al., 2004). Já em *Urophonius brachycentrus* (Thorell, 1876) (Scorpiones, Bothriuridae), conhecidos como escorpiões de buraco, os machos identificam suas parceiras sexuais através de compostos voláteis liberados por elas e não reagem a compostos químicos de contato (ROMERO-LEBRÓN et al., 2019). Sugere-se que os feromônios liberados por machos no substrato também servem para evitar a competição intrasexual, possibilitando machos coespecíficos se identificarem e evitarem sobreposição de área de uso (MELVILLE et al., 2003; MILLER & FORMANOWICZ, 2011).

Compostos químicos produzidos por fêmeas da espécie *H. arizonensis* no período reprodutivo parecem elicitar reações comportamentais diferentes nos machos, de acordo com a quantidade liberada no ambiente. Feromônios de contato liberados pelas fêmeas no substrato, quando em pequenas quantidades, são supostamente utilizados para sinalizar ao macho sua presença no ambiente (MELVILLE et al., 2003); enquanto que quantidades maiores parecem induzir o comportamento de pré-corte dos machos, que consiste em uma série de movimentos corporais para sinalizar a procura de uma parceira sexual.

As alterações comportamentais de escorpiões diante da detecção de pistas e/ou sinais químicos são bem documentadas. Os machos realizam uma série de comportamentos característicos, desde andar lentamente, paradas abruptas seguidas de passos para trás, estremecimento do corpo e balançar do metassoma (PERETTI & ACOSTA, 1999; POLIS, 1990; GAFFIN & BROWNELL, 1992; MELVILLE et al., 2003; MILLER & FORMANOWICZ, 2011; TAYLOR et al., 2012).

O comportamento de cópula nos escorpiões envolve uma “dança” entre os sexos, que por sua vez compreende quatro fases descritas detalhadamente por Polis (1990): 1) início, se dá através da aproximação do parceiro sexual, com o macho geralmente tomando a iniciativa; 2) *promenade à deux*, com a fêmea correspondendo ao macho, os dois indivíduos se agarram por seus pedipalpos, e iniciam um "passeio" em busca de um local para a deposição do espermatóforo; 3) transferência do espermatóforo, após a deposição do espermatóforo no substrato, o macho redireciona a fêmea de forma que sua abertura genital se acople com o espermatóforo, para realizar a transferência do mesmo; e 4) término, ocorre a separação dos indivíduos. A corte, que é o período no qual o macho fica em contato direto com a fêmea pode durar de 5 min até 48 h (POLIS, 1990) e a reação comportamental da fêmea diante da aproximação e comportamento do macho é um fator chave para que ocorra a reprodução, visto que há situações onde a fêmea não reconhece o macho como um parceiro sexual, o que resulta em canibalismo pré-corte (PERETTI & ACOSTA, 1999). Desta forma, uma hipótese para explicar a redução de canibalismo pré-corte nos escorpiões é que a mesma seja dependente de que o reconhecimento entre parceiros seja dado pela movimentação da fêmea em reação à aproximação do macho.

2.4 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE DE ESCORPIÃO *Tityus pusillus* POCOCK, 1893

O gênero *Tityus* Koch, 1836 que contém cerca de 223 espécies (REIN, 2017), representa a maior riqueza de espécies da família Buthidae, sendo encontrados desde a Costa Rica até a Argentina Central e Republica Dominicana (FRANCKE & STOCKWELL, 1987; ARMAS & ANTUN, 2004; AFFILASTRO, 2005). No Brasil, 47 espécies do gênero (ALMEIDA, 2010) podem ser encontradas em quase todos os biomas (LOURENÇO, 2002).

Escorpiões da espécie *Tityus pusillus* Pocock, 1893 variam em seu tamanho, entre 25 - 34 mm, apresentam uma coloração que vai desde amarelada até marrom-avermelhada, com manchas pretas por todo o seu corpo e tendo os dois últimos segmentos do metassoma e o télson avermelhado (LOURENÇO, 1982). Sua descrição original é do estado de Pernambuco, a partir de uma coleta

na região de Igarassu (LOURENÇO, 1982). A espécie apresenta ampla distribuição na região Nordeste do Brasil, onde representa um quantitativo de 90% da fauna escorpiônica da Floresta Atlântica, também possuindo registros de ocorrência na Caatinga (LOURENÇO, 2002; DIAS et al., 2006; PORTO et al., 2014; LIRA & ALBUQUERQUE, 2014; LIRA et al., 2018). Na Floresta Atlântica são encontrados em menor abundância na borda dos fragmentos, em contrapartida ocupam três vezes mais os seus interiores (DIONISIO-DA-SILVA et al., 2018). Podem ser encontrados principalmente no epifolhicho, apresentando uma correlação positiva com a massa seca da liteira, performam um comportamento de caça denominado como “senta e espera” no qual ficam parados à espera da aproximação de uma presa, comportamento típico para escorpiões (POLIS, 1990; LIRA et al., 2013; LIRA & DE SOUZA, 2014; LIRA et al., 2015).

T. pusillus reproduzem-se de forma sexuada, apresentando um comportamento típico de corte em escorpiões (POLIS, 1990; LIRA et al., 2018; DIONISIO-DA-SILVA et al., 2018). Essa espécie apresenta iteroparidade, fêmeas podem ter até três ninhadas durante um ano com a duração gestacional em média de três meses. O tamanho das proles varia de 8 - 12 filhotes, independentemente do tamanho da fêmea, e os juvenis realizam quatro mudas para atingir a fase adulta, com tempo de desenvolvimento de 8 meses. A protandria é observada na espécie, com machos atingindo a maturidade em média 1 mês antes das fêmeas (ALBUQUERQUE & LIRA, 2016; LIRA et al., 2018). O dimorfismo sexual é evidente, no maior comprimento total do prossoma e mesossoma das fêmeas, metassoma mais longo dos machos, que além disso também apresentam quinto segmento do metassoma e quelas mais largas (LIRA et al., 2018).

Existem evidências de que os machos de *T. pusillus* identificam fêmeas coespecíficas através do contato direto de seus pentes com o substrato previamente ocupado por elas, o que altera o comportamento de locomoção não-direcionada dos machos para o de busca ativa pela fêmea, sugerindo que as fêmeas podem deixar rastros químicos no ambiente onde se encontram (PORDEUS et al., 2019). Segundo Lira et al. (2018), dentre os comportamentos realizados na fase I de corte da espécie, a maioria dos machos iniciam a corte

após a detecção dos movimentos da fêmea, quando as fêmeas estão imóveis, os machos as identificam após passar por cima ou toca-las no mesossoma e metassoma. Além disso a descrição do processo de corte demonstra que a reação comportamental da fêmea, logo após a fase de iniciação, às investidas sexuais do macho são um fator importante para o sucesso da cópula (LIRA et al., 2018).

A partir disso levantamos duas hipóteses para explicar como os machos da espécie *T. pusillus* realizam o reconhecimento sexual da fêmea: i) via movimentos da fêmea após a aproximação do macho, o que sugere aceitação por parte da mesma para início da corte. Se essa hipótese se confirmar, espera-se que os machos não sejam capazes de proceder com o processo de corte nem sejam capazes de depositar o espermatóforo no substrato quando colocados para copular com fêmeas inertes; ii) via HCs, assim os machos só seriam capazes de distinguir entre fêmeas e machos coespecíficos através da detecção de HCs. Se essa hipótese se confirmar, espera-se que os machos sejam incapazes de iniciar a corte diante de machos ou fêmeas na ausência dos HCs.

3 MÉTODO

3.1 COLETA E MANUTENÇÃO

Os escorpiões utilizados neste estudo foram coletados entre março e junho de 2019 e setembro e outubro de 2020 em um fragmento de Floresta Atlântica situado nas dependências do Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti (CIMNC), na Zona da Mata do estado de Pernambuco (07°50'32.7"S, 35°06' 33.2"W). Os espécimes de *T. pusillus* foram coletados através de busca ativa realizada no período da noite com o auxílio de fontes de luz ultravioleta. Os escorpiões foram submetidos a triagem para a separação dos sexos (LIRA *et al.*, 2018) e, posteriormente, transportados ao Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA) na Universidade Federal de Pernambuco, onde foram mantidos em recipientes plásticos de 30 L. No laboratório ninfas da espécie *Gryllus assimilis* Fabricius, 1775 (Orthoptera, Gryllidae) e água foram fornecidos duas vezes por semana. Foram mantidos em condições controladas de temperatura (24,5°C ± 2°C), fotoperíodo (12h: luz; 12h: escuro) e umidade relativa do ar (60%).

3.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HCs

Para observar se há diferença sexual nos perfis de HCs da espécie *T. pusillus*, foram realizadas extrações cuticulares de fêmeas (n = 50) e machos (n = 40). Machos e fêmeas foram acondicionados em recipientes de vidro, previamente lavados com água e sabão, etanol e autoclavados (92 °C). Para a eutanásia por congelamento (-24 °C), os indivíduos sexualmente separados permaneceram no freezer até a realização dos extratos, para a obtenção das amostras.

Para extração, foi utilizado 10 mL de n-hexano como solvente, onde grupos de cinco (5) escorpiões foram imersos e agitados manualmente por um período de 15 min. Transcorrido o tempo de agitação, os escorpiões foram secos por descanso em papel toalha. A solução obtida passou por filtração através da

lã de vidro em pipeta de vidro silanizado de 1 mL para a retenção das partículas sólidas e posteriormente concentradas sobre um fluxo laminar de nitrogênio para a obtenção do volume final de 200 µL correspondendo ao total de uma amostra. Todo o processo foi repetido até a obtenção de 10 amostras de fêmeas e 8 amostras de machos. A extração cuticular e as análises das amostras de extratos obtidos foram realizados no Laboratório de Ecologia Química, no Departamento de Química Fundamental da UFPE.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadruplo Agilent 5975C Series (Agilent Technologies, Palo alto, USA), equipado com coluna apolar HP-5ms (Agilent J&W, 60 m x 0.25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0.25 µm). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de 60 °C (mantida por 1 min), rampa de aquecimento de 15 °C/min e temperatura final de 260 °C, que foi mantida por 20 min. O gás de arraste utilizado foi o He, a fluxo constante de 1 mL/min e a temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons à 70 eV. A fonte de ionização foi mantida a 230 °C e o quadrupolo a 150 °C. Os espectros de massa foram obtidos no modo scan com velocidade de 0,5 scan/s, com faixa de varredura de m/z de 35 a 550. Uma alíquota de 1 µL de cada amostra foi injetada em modo *splitless*. Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes dos extratos cuticulares utilizando-se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de alcanos (C9 a C34) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2014).

3.3 RECONHECIMENTO SEXUAL COM FÊMEAS INERTES E PRESENÇA DE RASTROS QUÍMICOS

Para testar se a movimentação e reação comportamental da fêmea diante da investida do macho é o fator determinante no reconhecimento sexual, machos foram colocados em arenas experimentais pareados com fêmeas inertes.

Para testar se os rastros químicos no substrato podem ser os responsáveis em eliciar o comportamento de corte dos machos frente as fêmeas inertes, machos foram colocados em arenas experimentais previamente ocupada por fêmeas e pareados com fêmeas inertes. Como arenas experimentais, foram utilizadas placas de Petri de vidro (13 cm Ø) forradas com papel filtro. Os experimentos foram realizados no período entre as 18:00 e 22:00h, quando os escorpiões tornam-se ativos.

Para deposição de rastros químicos, uma fêmea foi colocada para transitar por toda a arena por um período de 24 h, que é o tempo considerado adequado para a deposição de pistas químicas por fêmeas de *T. pusillus* (PORDEUS et al., 2019). Em seguida, a fêmea foi retirada e morta por congelamento rápido. Depois de normalizada sua temperatura (exposição à temperatura ambiente por 10 min), ela foi recolocada na arena experimental. Um macho de *T. pusillus* foi colocado a arena do lado oposto, tendo sua movimentação restringida por um domo de plástico por 5 min para aclimação. Passado esse intervalo, o domo foi retirado, deixando o macho livre para se movimentar sobre a placa de Petri.

Os comportamentos foram registrados por 25 min com o auxílio de uma filmadora Canon XA10 HD. Aproximadamente 23 horas de vídeos foram analisados e a ocorrência e frequência dos comportamentos pré toque e pós toque foram registrados, classificados em um ranking de 1 a 5, seguindo o método de ranqueamento proposto por Taylor et al. (2012), posteriormente adaptado por Pordeus et al. (2019) (Tabela 1).

Cada arena experimental com um macho e uma fêmea inerte foi considerada uma repetição, com um total de 26 repetições. Machos que não se movimentaram durante os 25 min foram desconsiderados da análise.

Tabela 1 - Rankings dos comportamentos pré-toque e pós-toque realizados por machos de *Tityus pusillus* em arenas com e sem a presença de vestígios químicos.

Rankings	Descrição dos atos comportamentais	
	Pré-toque	Pós- toque
1	O macho focal anda pela arena experimental tocando e escalando as paredes	O macho focal anda pela arena experimental tocando e escalando as paredes

2	O macho focal se locomove lentamente pela arena experimental	O macho focal se locomove lentamente pela arena experimental ou realiza o segundo toque na fêmea inerte
3	“Backstep” ou para repentinamente e movimenta-se para trás	O macho focal segura a fêmea com suas quelas em qualquer parte do corpo e/ou a puxa
4	O macho focal realiza dois comportamentos do ranking 3	O macho focal realiza dois comportamentos ranking 3
5	O macho focal realiza três comportamentos ranking 3 ou o “Juddering” (tremor o corpo)	O macho focal realiza três comportamentos ranking 3 ou “Juddering” (tremor o corpo) ou balança o metassoma

Fonte: Barbosa-da-Silva, H (2021).

3.4 RECONHECIMENTO SEXUAL SEM HCs

Para testar a hipótese de que os HCs influenciam o reconhecimento e comportamento sexual dos machos de *T. pusillus*, machos foram pareados com machos e fêmeas inertes desprovidos de HCs.

Para a realização do processo de lavagem da cutícula, os machos mortos por congelamento foram transportados em três grupos de 10 indivíduos a um becker de 1 L contendo 20 mL de solvente (grau HPLC) e agitados manualmente por 10 min, o processo foi efetuado duas vezes com hexano e duas vezes com metanol. O mesmo procedimento foi executado com as fêmeas inertes. Após a lavagem da cutícula, os indivíduos foram congelados até a realização dos ensaios comportamentais. Os indivíduos lavados foram deixados em temperatura ambiente por 10 min e colocados na arena com um macho vivo.

Todos os ensaios foram realizados no período noturno entre as 18:00 e 23:00h, sendo fêmeas grávidas identificadas e excluídas dos experimentos. O procedimento foi realizado simultaneamente com machos e fêmeas lavados e alocados em arenas individuais. As placas de Petri foram posicionadas sobre uma superfície de poliestireno para minimizar possível interferência entre os ensaios provocadas pela movimentação dos machos. Apenas foram considerados válidos os ensaios comportamentais em que os machos realizaram o contato direto com o indivíduo imóvel, sendo descartados os demais.

Tabela 2 - Rankings dos comportamentos realizados por machos de *Tityus pusillus* frente a machos e fêmeas lavados com hexano e metanol.

Rankings	Descrição dos atos comportamentais
1	O macho focal ignora o indivíduo e se movem pela arena, tocando e escalando as paredes da arena
2	O macho focal anda lentamente após o primeiro toque com o indivíduo e/ou realizam o segundo toque.
3	O macho focal segura o indivíduo em qualquer parte do corpo e puxa
4	O macho focal realiza dois comportamentos ranking 3
5	O macho focal realiza três comportamentos ranking 3 ou treme o corpo ou balança o metassoma

Fonte: Barbosa-da-Silva, H (2021).

Além dos aspectos comportamentais, tanto para o ensaio comportamental do reconhecimento sexual com fêmeas inertes e presença de rastros químicos, quanto para o experimento de reconhecimento sexual sem HCs, o número de toques que o macho focal realizou nos indivíduos inertes, o número de investidas (tentativas de segurar os indivíduos) e o tempo total das investidas (tempo total que o macho focal esteve segurando os animais inertes) foram registrados.

3.5 ANÁLISE DE DADOS

Para determinar se houve diferença entre as composições dos HCs entre machos e fêmeas foi utilizado o teste PERMANOVA. Os dados comportamentais foram analisados através do teste dos postos sinalizados de Wilcoxon para determinar se houve diferença nos comportamentos pré-toque e pós-toque realizados pelo macho focal dos ensaios de reconhecimento sexual com fêmeas inertes e presença de rastros químicos e entre os comportamentos realizados do experimento de reconhecimento sexual sem HCs. O número de toques, número de investidas e o tempo total das investidas pelo macho focal com os indivíduos inertes dos experimentos foram analisados para normalidade com o teste de

Shapiro-Wilks e o teste Kruskal Wallis para variância, os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram executadas usando o programa estatístico BioEstat versão 5.3.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS DE CUTÍCULA

Nos extratos cuticulares de *T. pusillus*, foram identificados hidrocarbonetos lineares e ramificados em sua maioria saturados com cadeia de 24 a 33 átomos de carbono representando mais de 65% dos compostos totais das amostras além de dois ésteres alifáticos: palmitato de metila e palmitato de isopropila. A presença de álcoois e aldeídos alifáticos também foi identificada, com os aldeídos graxos se apresentando em maioria, sendo o Octacosanal exclusivo de fêmeas. Houve diferença significativa entre as composições dos HCs de machos e fêmeas (PERMANOVA: $F = 3,361$, $p = 0,0542$). Entre os alcanos lineares, Nonacosano é o principal composto majoritário encontrado para ambos os sexos, seguido do heptacosano e pentacosano, com o tetracontano sendo exclusivo de machos. Quatro derivados de esterol foram registrados, com apenas um (m/z 43, 55, 57, 105, 386) em comum entre machos e fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfil dos hidrocarbonetos cuticulares de *Tityus pusillus* obtidos por imersão em hexano. * presente apenas em uma amostra.

	IR**	<i>Tityus pusillus</i>	
		Fêmea (n = 5)	Macho (n = 2)
Alcanos lineares			
Heneicosano	2100	0,18 ± 0,07	0,03 ± 0,01
Docosano	2200	0,43 ± 0,16	0,16 ± 0,03
Tricosano	2230	0,44 ± 0,34	0,41 ± 0,13
Tetracosano	2400	1,57 ± 0,66	2,21 ± 0,65
Pentacosano	2500	7,21 ± 2,91	7,02 ± 1,26
Hexacosano	2600	4,21 ± 2,08	6,12 ± 2,18
Heptacosano	2700	8,92 ± 2,72	10,40 ± 0,79
Octacosano	2800	5,43 ± 2,56	8,39 ± 1,69
Nonacosano	2900	12,03 ± 1,90	15,67 ± 1,94
Triacotano	3000	4,07 ± 1,73	6,48 ± 1,13
Hentriacotano	3100	6,47 ± 1,01	8,41 ± 0,14
Dotriacotano	3200	1,64 ± 0,70	2,72 ± 0,30
Tritriacotano	3300	1,47 ± 0,24	1,86 ± 0,03
Tetracontano	3400	----	0,12 ± 0,06
Alcanos ramificados			
2-Methylheptacosano	2762	0,94 ± 1,07	0,46 ± 0,45
3-Methylheptacosano	2773	0,17 ± 0,06	0,11*
2-Methyloctacosano	2861	1,32 ± 0,70	2,09 ± 1,39
2-Methylnonacosano	2961	0,57 ± 0,42	0,55 ± 0,65
3-Methylnonacosano	2973	0,35 ± 0,21	0,18 ± 0,14
2-Methyltriacontano	3061	1,28 ± 1,24	1,06 ± 0,17
m/z 57,71,85,43,99	3129	----	5,34 ± 2,25
m/z 57,71,85,43,99	3154	----	1,31 ± 0,52
m/z 57,71,85,196,224	3326	0,40 ± 0,22	0,21*
3-Methyltriacontano	3373	----	0,15*
Ácidos e anidridos graxos			
Ácido hexadecanóico (palmítico)	1962	3,25 ± 0,86	4,62 ± 3,66
m/z 127,57,99,156,213	2080	0,28 ± 0,17	0,17 ± 0,07
Ácido <i>cis</i> -9-octadecenóico (oleico)	2143	0,72 ± 0,72	1,13 ± 0,78
Ácido octadecanóico (esteárico)	2164	0,67 ± 0,10	0,88 ± 0,89
m/z 55,43,41,69,83	2368	0,38 ± 0,14	0,07*
Álcoois graxos			
n-Octadecanol	2091	0,84 ± 0,69	0,03*
m/z 97,83,69,55,43 (n-Hexacosanol)	2887	----	1,07*
Aldeídos graxos			
Icosanal	2231	0,39 ± 0,16	0,14 ± 0,01
Heneicosanal	2334	0,66 ± 0,34	0,30 ± 0,02
Docosanal	2435	1,58 ± 0,51	1,41 ± 0,27
Tricosanal	2536	1,15 ± 0,60	0,94 ± 0,17
Tetracosanal	2637	0,91 ± 0,31	0,26 ± 0,08
Pentacosanal	2739	0,27 ± 0,13	0,06 ± 0,00
Hexacosanal	2840	0,43 ± 0,21	0,07*
Heptacosanal	2942	0,12*	----
Octacosanal	3043	0,12 ± 0,01	----
Ésteres de ácidos graxos			
Hexadecanoato de metila (palmitato de metila)	1928	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,00
Hexadecanoato de isopropila (palmitato de isopropila)	2026	0,43 ± 0,07	0,10 ± 0,02

Compostos não-assinalados / Outros compostos			
4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olida	2371	0,31 ± 0,17	0,07*
<i>m/z</i> 57,83,43,97,55	2708	2,55 ± 1,30	----
<i>m/z</i> 57,71,85,43,196	2731	0,32 ± 0,21	0,09*
Esqualeno	2839	1,08*	0,33*
<i>m/z</i> 55,96,82,69,83	2879	----	0,74 ± 0,78
<i>m/z</i> 57,71,85,43,99	2929	3,12 ± 1,00	4,65 ± 2,36
<i>m/z</i> 57,71,85,43,99	2957	0,66 ± 0,81	----
Derivados de esterol			
<i>m/z</i> 57,185,157,266,251	3036	2,01 ± 1,66	----
<i>m/z</i> 157,185,266,326,251	3050	0,52 ± 0,49	----
<i>m/z</i> 57,185,157,266,340	3126	19,44 ± 11,72	----
<i>m/z</i> 43,55,57,105,386	3151	0,49 ± 0,18	0,61 ± 0,39
<i>m/z</i> 57,159,157,145,105	3227	0,88 ± 0,72	----
Outros			
		2,27 ± 1,34	1,70 ± 0,91

Fonte: Barbosa-da-Silva, H (2021).

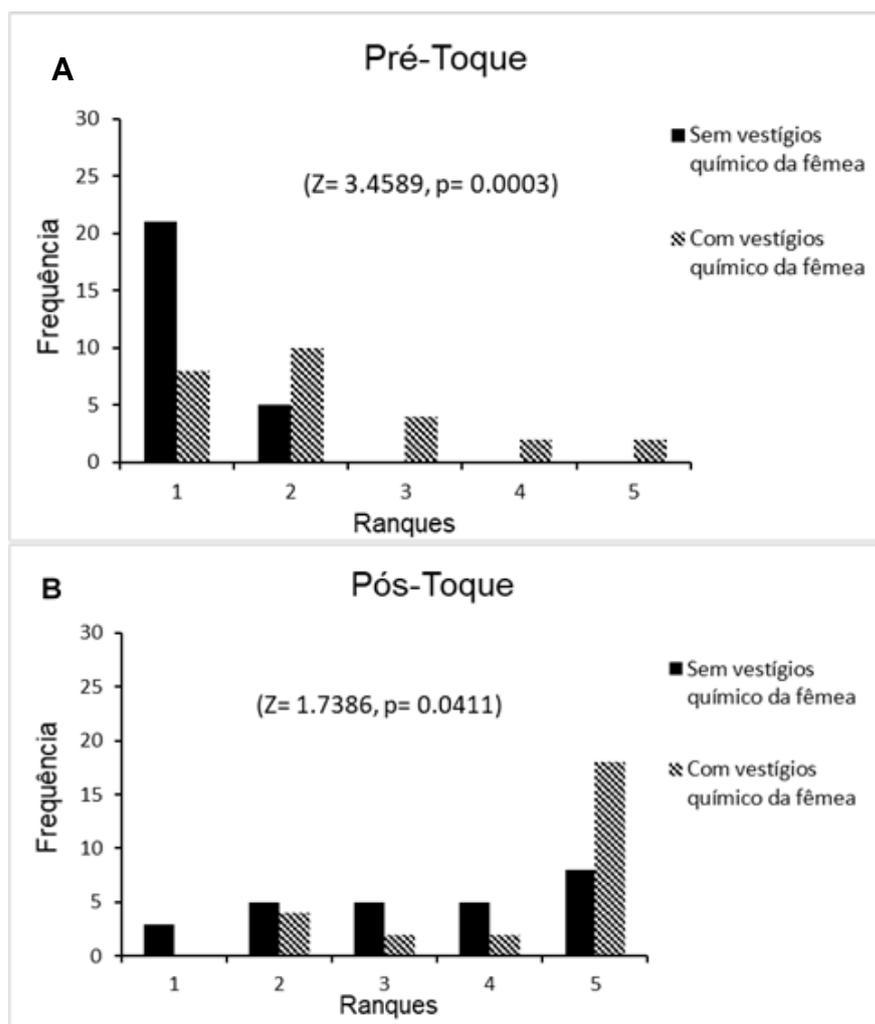
**IR: Índice de Retenção de um componente.

4.2 RECONHECIMENTO SEXUAL COM FÊMEAS INERTES E PRESENÇA DE RASTROS QUÍMICOS

Os machos focais apresentaram mudanças em seus comportamentos pré-toque na arena com vestígios químicos da fêmea ($Z = 3,4589$; $p = 0,0003$), além de apresentar comportamentos sexuais com a fêmea após seu primeiro toque ($Z = 1,7386$; $p = 0,0411$) (Figura 1A,B).

A maioria dos indivíduos na arena sem vestígios químicos da fêmea (81%) não demonstraram alteração comportamental antes de toca-la (Ranking 1). Já os indivíduos da arena com vestígios químicos apresentaram alterações comportamentais antes de as tocar. A maioria dos machos (69%) apresentaram paradas bruscas seguidas de busca direcionada pela fêmea até realizar o “Juddering”, comportamentos equivalentes aos rankings 2, 3, 4 e 5 (Figura 1A).

Figura 1 - (A) Comparação das frequências dos ranques comportamentais de pré-toque, entre o grupo sem vestígios químicos da fêmea e com vestígios químico da fêmea realizados por machos de *Tityus pusillus*. (B) Comparação das frequências dos ranques comportamentais de pós-toque, entre o grupo sem vestígios químicos da fêmea e com vestígios químico da fêmea realizados por machos de *Tityus pusillus*.



Fonte: Barbosa-da-Silva, H (2021).

Após o primeiro toque na fêmea imóvel, aproximadamente 49% dos machos no substrato sem vestígios químicos da fêmea esboçaram reações de interesse, tocando-a, segurando-a ou até mesmo a puxando para próximo de si, os 51% dos machos restantes realizaram comportamentos referentes ao ranking 4 e 5. Já 76% dos machos no substrato com vestígio químico, após o primeiro contato

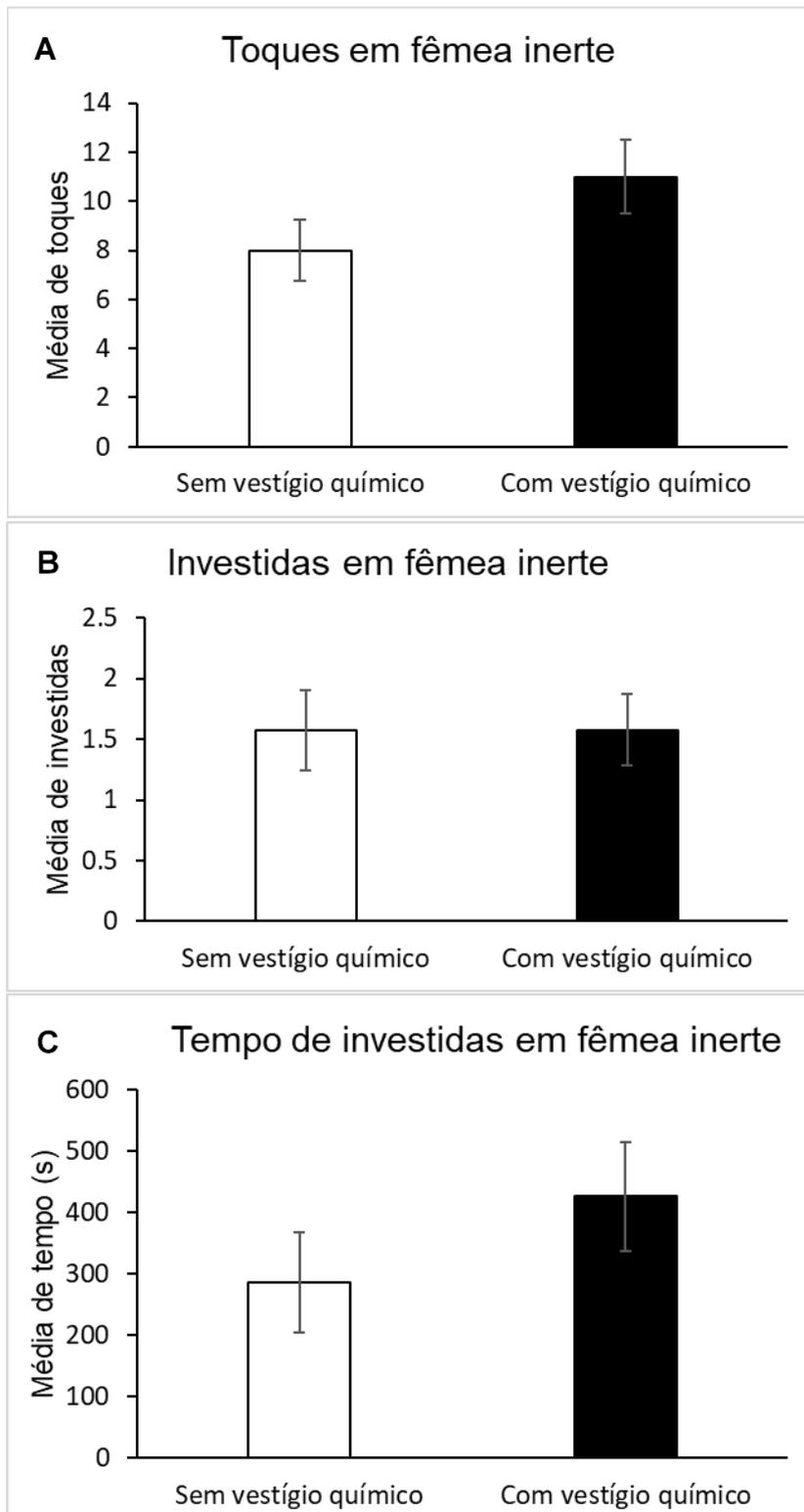
direto com a fêmea, seguraram qualquer parte do seu corpo puxando-a para próximo de si, tremendo e/ou balançando o metassoma e os 24% dos machos restantes realizaram comportamentos referentes aos Rankings 2 e 3, todos os machos demonstraram alteração em seu comportamento (Figura 1B). Três indivíduos na arena sem vestígios químicos e dois na arena com vestígios químicos chegaram à fase de término da cópula, depositando seus espermatozoides no substrato.

Em ambos os ensaios com a fêmea imóvel houve mudanças pontuais no comportamento de cópula do macho. A maioria dos machos (sem vestígios químicos da fêmea $n = 10/26$; com vestígios químicos da fêmea $n = 19/26$) agarraram o télson ou a quela e o terceiro par perna com as quelas e puxaram a fêmea a seu encontro, realizando constantes toques de suas quelíceras no corpo da fêmea.

Não houve diferença no número de toques que o macho focal realizou nas fêmeas inertes entre os dois ensaios comportamentais ($H = 2,1081$; $p = 0,1465$), assim como não houve diferença no número total de investidas ($H = 0,0044$; $p = 0,9471$) e no tempo de duração das investidas que o macho focal realizou nas fêmeas inertes ($H = 1,7123$; $p = 0,1907$) (Figura 2A, B e C).

Figura 2 - (A) Média e erro padrão de toques que o macho focal realizou nas fêmeas inertes em substrato sem e com seus vestígios químicos. (B) Média e erro padrão de vezes que o macho

focal segurou as fêmeas inertes em substrato sem e com seus vestígios químicos. (C) Média de tempo que o macho focal passou segurando as fêmeas inertes em substrato sem e com seus vestígios químicos.



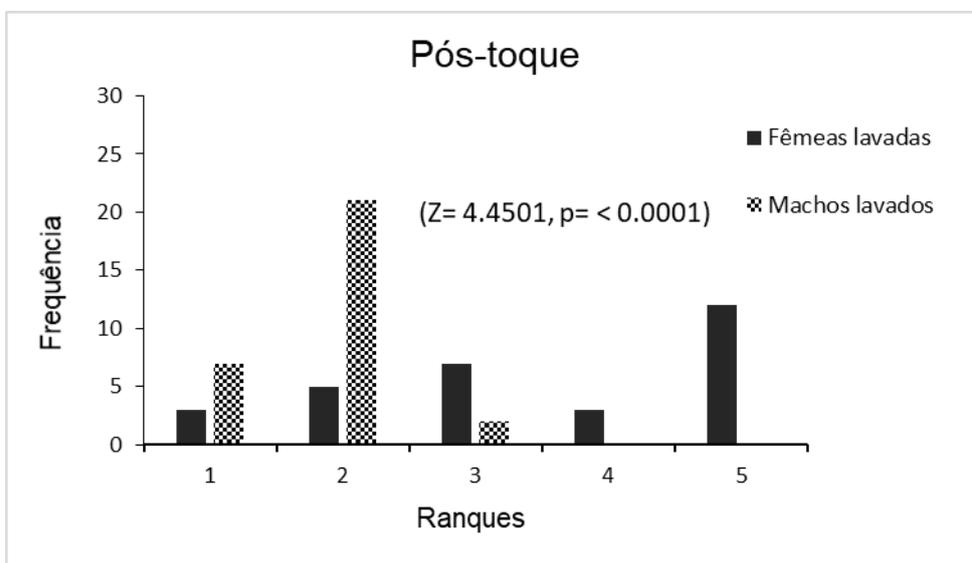
Fonte: Barbosa-da-Silva, H (2021).

4.3 RECONHECIMENTO SEXUAL SEM HCs

A ausência dos HCs não afetou o reconhecimento sexual em *T. pusillus*. Houve maior realização de comportamentos sexuais dos machos focais após o contato direto com as fêmeas inertes lavadas quando comparados aos machos inertes e lavados ($Z = 4,4501$; $p < 0,0001$) (Figura 3).

Os machos focais demonstraram interesse após o primeiro contato físico direto com as fêmeas, aproximadamente 73% seguraram, puxaram, realizaram o “Juddering” e balançaram o metassoma, comportamentos referentes aos rankings 3, 4 e 5 (Figura 3). Nove indivíduos chegaram a terminar a cópula após a deposição do espermatozóide no substrato. Já quando os machos focais realizaram o primeiro toque nos machos inertes e lavados, aproximadamente 93% dos machos ignoraram e continuaram andando e tocando as paredes da arena ou realizou um segundo toque (28/30). Apenas dois indivíduos tentaram segurar os machos inertes com suas quelas, porém não houve deposição do espermatozóide em nenhum dos experimentos com machos reagindo a machos lavados (Figura 3).

Figura 3 - Comparação das frequências dos ranques comportamentais de pós-toque, entre fêmeas e machos lavados com hexano e metanol, realizados por machos de *Tityus pusillus*.

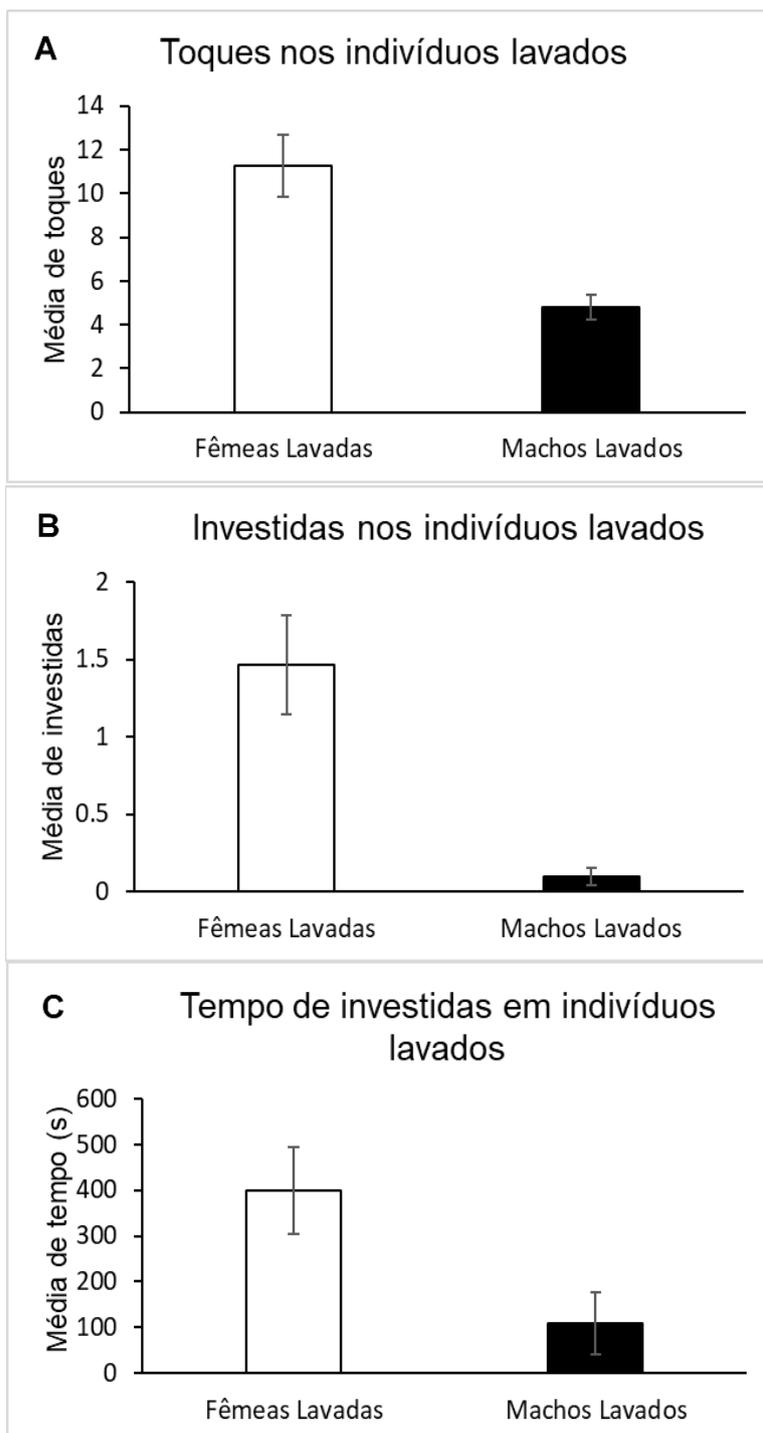


Fonte: Barbosa-da-Silva, H (2021).

O macho focal realizou aproximadamente 2 vezes mais toques nas fêmeas lavadas nos machos lavados ($H = 19,7077$; $p < 0,0001$) (Figura 4A), apresentaram aproximadamente 14 vezes mais investidas nas fêmeas (44

investidas) que nos machos (3 investidas) ($H = 16,1936$; $p < 0,0001$) (Figura 4B) e passaram aproximadamente 3,7 vezes mais tempo segurando as fêmeas com suas quelas do que os machos lavados ($H = 12,5005$; $p = 0,0004$) (Figura 4C).

Figura 4. (A) Média e erro padrão de toques que o macho focal realizou nos indivíduos lavados com hexano e metanol. (B) Média e erro padrão de vezes que o macho focal segurou os indivíduos lavados com hexano e metanol. (C) Média de tempo que o macho focal passou segurando os indivíduos lavados com hexano e metanol.



Fonte: Barbosa-da-Silva, H (2021).

5 DISCUSSÃO

Foi identificada diferença qualitativa no perfil de HCs entre fêmeas e machos da espécie *T. pusillus*, com compostos exclusivos tanto para machos quanto para fêmeas. A diferença sexual quantitativa de HCs foi registrada para *Smeringurus mesaensis* e *Handrurus arizonensis* (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010). Em *Paruroctonus mesaensis* os hidrocarbonetos foram os compostos mais abundantes encontrados na cutícula, seguidos de esteróis, alcóois, ácidos graxos livres e triacilgliceróis em pequenas quantidades (HADLEY & JACKSON, 1977). n-Alcanos foram representativos, com o nonacosano e hentriaconotano em maior concentração, seguindo o mesmo padrão de caracterização dos HCs em *P. mesaensis*. Entre os esteróis, o colesterol foi o único componente em concentração identificável no extrato de HCs em *P. mesaensis* (HADLEY & JACKSON, 1977). A presença de três derivados de esteróis exclusivos às fêmeas de *T. pusillus* identificados aqui podem estar presentes nos rastros químicos deixados por elas no substrato. A partir de poucas análises por GC-MS, ainda inconclusivas, feitas de lavagens de papéis de filtro com hexano, constatamos a presença de traços desses compostos onde fêmeas estiveram transitando por 48 h. Mais repetições devem ser feitas para se obter uma conclusão sobre a composição destes feromônios sexuais. A resposta comportamental do macho foi registrada, tanto a áreas pré-ocupadas por fêmeas, quanto a áreas expostas ao extrato de seus HCs, no escorpião *P. mesaensis* (GAFFIN & BROWNELL, 1992).

Machos de *T. pusillus* quando entram em contato direto com uma fêmea coespecífica imóvel, realizam reconhecimento sexual, mesmo na ausência de estímulos comportamentais e/ou mecânicos na arena experimental. Essa resposta foi influenciada por pistas/sinais químicos depositados no substrato pela fêmea, que intensificaram as reações dos machos ao encontrá-las e induzindo o comportamento de corte. Estes resultados corroboram uma série de investigações acerca das respostas comportamentais de algumas espécies de escorpiões frente a semioquímicos (PERETTI & ACOSTA, 1999; MELVILLE, 2003; MILLER & FORMANOWICZ, 2011; TAYLOR *et al.*, 2012; PORDEUS *et al.*, 2019), sugerindo uma mudança de paradigma que posicionava esses

artrópodes como organismos essencialmente responsivos a estímulos processados por mecanorreceptores (BROWNELL, 2001).

Por sua vez o toque das quelas do macho nas fêmeas inertes pode ser considerado como um comportamento de reconhecimento, visto que a presença de estruturas de detecção química e física (os tricobótrios) estão em sua maioria nos pedipalpos (POLIS, 1990; BROWNELL, 2001). Já o ato de segurar as fêmeas com a realização de comportamentos sexuais antes, depois ou em conjunto, como balançar o telson, tremer o corpo, puxar e empurrar a fêmea, podem discriminar a intenção do macho com relação as suas investidas. “Puxar e aproximar” é o comportamento de corte mais frequentemente registrado durante o *promenade à deux* em *Bothriurus bonariensis* (Koch, 1842) (Scorpiones, Bothriuridae), assim como agarrar a fêmea por qualquer parte corporal seguida de reorientação até a posição quelícera-quelícera (OLIVERO *et al.*, 2017). Em *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones, Buthidae), o macho demonstra seu interesse sexual com as trepidações de seu corpo antes ou após o contato direto com as fêmeas, a tentativa de segurá-las vem logo em seguida, com as contínuas trepidações (BRICEÑO & BONILLA, 2009).

A hipótese que coloca os HCs como um fator fundamental para o reconhecimento sexual das fêmeas pelos machos não encontra suporte diante dos experimentos realizados, visto que estes continuam realizando comportamentos sexuais diante de fêmeas que tiveram seus HCs retirados, ao mesmo tempo em que não demonstram interesse sexual por machos sem HCs. Há sugestão de que o reconhecimento sexual se dê através da percepção de diferenças físicas na superfície corporal das fêmeas pelo macho (ALEXANDER, 1959), que estaria relacionada a caracteres morfológicos dimórficos (CARRERA *et al.*, 2009; BOONCHAM *et al.*, 2007; FOX *et al.*, 2015; LIRA *et al.*, 2018). O presente estudo demonstra que a identificação sexual se dá através do toque direto em qualquer parte corporal da fêmea, não necessariamente em estruturas conspicuamente dimórficas.

Dos 30 machos que tiveram seus comportamentos observados, apenas dois machos (6%) realizaram investidas a outros machos sem HCs, porém um deles tentou canibalizar o macho inerte, deixando claro que sua investida não apresentava intenção sexual. Nenhuma tentativa de canibalismo foi registrada

para com as fêmeas sem HCs. Há registros de canibalismo em *T. pusillus*, feitas em campo a partir da observação de uma fêmea se alimentando de juvenil e outra canibalizando um macho adulto (LIRA et al., 2017) e o risco de canibalismo pré-corte por parte de fêmeas não receptivas e famintas também é bem documentado para escorpiões (PERETTI & ACOSTA, 1999; POLIS, 1980; BROWNELL, 2001).

Quando ambos os indivíduos envolvidos na corte estão vivos, a realização de comportamentos restritos a determinadas fases da corte é comum, como as ferroadas que o macho dá nas fêmeas para “acalmá-las” quando não estão muito receptivas na fase de iniciação (POLIS & FARLEY, 1979; POLIS, 1990). Normalmente os machos de *T. pusillus* iniciam a fase do *promenade à deux* ao segurar uma ou ambas as quelas da fêmea até a posição quelícera-quelícera (LIRA et al., 2018). Neste estudo os machos se depararam com fêmeas que não apresentam resposta comportamental e resistência às suas investidas sexuais, portanto se viram livres para manipular e segurar qualquer parte corporal das fêmeas e realizar movimentos como o de puxá-las, guiando as fêmeas inertes ao encontro de um local adequado para a deposição do espermátóforo. De 70 machos que tiveram seu comportamento de cópula registrado com fêmeas vivas, 78% chegaram a depositar o espermátóforo no substrato (LIRA et al., 2018). No presente estudo, apenas 25% dos machos realizaram a deposição do espermátóforo diante de fêmeas imóveis com e sem HCs, independentemente da presença de compostos deixados por fêmeas no substrato indicando que o comportamento de reação da fêmea é um importante fator para a finalização da cópula.

Em resumo, o reconhecimento dos vestígios químicos no substrato deixados pela fêmea é um gatilho para o comportamento de pré-corte, auxiliando o encontro do parceiro. No entanto, o reconhecimento através do contato direto com a fêmea é determinante para que haja o comportamento de corte. A ausência de movimentos por parte da fêmea não é um fator determinante no reconhecimento sexual. Apesar da presença de dimorfismo qualitativo dos HCs na espécie não há mediação do reconhecimento sexual através dos HCs. Portanto a sugestão de percepção de diferenças físicas na superfície corporal levantadas por estudos anteriores se mostram um fator considerável a ser

explorado em estudos futuros referentes ao reconhecimento sexual em *T. pusillus*.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que o perfil de hidrocarbonetos cuticulares da espécie *Tityus pusillus* apresenta dimorfismo qualitativo, no entanto os HCs não são mediadores do reconhecimento sexual. A ausência de movimentos realizados pela fêmea não é um fator determinante para o reconhecimento sexual na espécie e o reconhecimento ocorre através do contato direto entre o macho e a fêmea, que por sua vez é um fator determinante para que haja a realização da corte.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Texensis Publishing, 2017.

AFFILASTRO, O. A. A. Estudio monográfico de los escorpiones de la Republica Argentina. Revista Ibérica de Aracnología, v. 11, p 75-241, 2005.

ALBUQUERQUE, C. M. R. D.; LIRA, A. F. A. Insights into reproductive strategies of *Tityus* (Archaeotityus) *pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones, Buthidae). Comptes Rendus Biologies, v. 339, n. 5-6, p 179-184, 2016.

ALEXANDER, A. J.; Courtship and mating in the buthid scorpion. Proc. Zool. Soc, v. 133, p 145-169, 1959.

ALMEIDA, R. B. Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

ARMAS, L. F.; ABUD ANTUN, A. J. Adiciones al género *Tityus* C. L. Koch, 1836 en República Dominicana, con la descripción de dos especies nuevas (Scorpiones: Buthidae). Revista Ibérica de Aracnologia, v. 10, p 53-64, 2004.

BARUFFALDI, L.; COSTA, F. G.; Changes in male sexual responses from silk cues of females at different reproductive states in the wolf spider *Schizocosa malitiosa*. J Ethol, v. 28, p 75-85, 2010.

BENTON, T. G.; Courtship behaviour of the scorpion, *Euscorpis flavicaudis*. Bulletin of the British Arachnological Society, v. 9, n. 5, p 137-141, 1993.

BLOMQUIST, G. J.; JACKSON, L. L. Incorporation of labelled dietary n-alkanes into cuticular lipids of the grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Insect Physiology, v. 19, n. 8, p 1639-1647, 1973.

BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A. Contact recognition pheromones in spiders and Scorpions (Pages: 344-369) in Insect hydrocarbons biology, biochemistry and chemical ecology. United States of America: Cambridge university press, 2010.

BOONCHAM, U.; SITTHICHAROENCHAI, D.; PRADATSUNDARASAR, A.; PRASARNPUN, S.; THIRAKHUPT, K.; Sexual dimorphism in the Asian giant forest scorpion, *Heterometrus laoticus* Couzijn, 1981. NU Science Journal, v. 4, n.1, p 42-52, 2007.

BRICEÑO, R. D.; BONILLA, F.; Substrate vibrations in the scorpion *Centruroides margaritatus* (Scorpiones: Buthidae) during courtship. Journal of Tropical Biology, v. 57, p 267-274, 2009.

BROWELL, P.; G. A. POLIS. Scorpions Biology and Research. Oxford University Press. 544p. 2001.

CARRERA, P. C.; MATTONI, C. I.; PERETTI, A. V.; Chelicerae as male grasping organs in scorpions: sexual dimorphism and associated behaviour. Zoology, v. 112, p 332-350, 2009.

CERVEIRA, A. M.; JACKSON, R. R.; Love is in the air and on the ground: olfactory and tactile cues elicit visual courtship behavior by *Cyrrba* males (Araneae: Salticidae). Journal of Arachnology, v. 41(3), p 374-380, 2013.

CHUNG, H.; CARROLL, S. B. Wax, sex and the origin of species: dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. BioEssays, v. 37, n.7, p 822-830, 2015.

DAPPORTO, L.; PALAGI, E.; TURILLAZZI, S. Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominulus* as a biogeographic tool: a study of populations from the Tuscan Archipelago and surrounding areas. Journal of chemical ecology, v. 30, n. 11, p 2139-2151, 2004.

DIAS, S. C.; CANDIDO, D. M.; BRESCOVIT, A. Scorpions from Mata do Buraquinho, João Pessoa, Paraíba, Brazil, with ecological notes on a population of *Ananteris mauryi* Lourenço (Scorpiones, Buthidae). Revista Brasileira de Zoologia, v. 23, n. 3, p 707-710, 2006.

DIONISIO-DA-SILVA, W.; LIRA, A. F. A; ALBUQUERQUE, C. M. R. Distinct edge effects and reproductive periods of sympatric litter-dwelling scorpions (Arachnida: Scorpiones) in a Brazilian Atlantic forest. Zoology, v. 129, p 17-24, 2018.

ELIAS, D. O.; MASON, A. C.; HOY, R. R.; The effect of substrate on the efficacy of seismic courtship signal transmission in the jumping spider *Habronattus dossenus* (Araneae: Salticidae). *The Journal of Experimental Biology*, v. 207, p 4105-4110, 2004.

ELIAS, D. O.; SIVALINGHEM, S.; MASON, A. C.; ANDRADE, M. C. B.; KASUMOVICŞ.; Vibratory communication in the jumping spider *Phidippus clarus*: Substrate-borne courtship signals are important for male mating success. *Ethology*, v. 116, p 990-998, 2010.

ENDLER, A.; LIEBIG, J.; SCHMITT, T.; PARKER, J. E.; JONES, G. R.; SCHREIER, P.; HÖLLDOBLER, B. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 9, p 2945-2950, 2004.

FERNANDES, N. S.; STANLEY, E.; COSTA, F. G.; TOSCANO-GADEA, C. A.; WILLEMART, R. H. Chemical sex recognition in the harvestman *Dyscocyrtus prospicuus* (Arachnida: Opiliones). *Acta Ethologica*, v. 20, p 215-221, 2017.

FLETCHER, M. T.; ALLSOPP, P. G.; MCGRATH, M. J.; CHOW, S.; GALLAGHER, O. P.; HULL, C.; CRIBB, B. W.; MOORE, C. J.; KITCHING, W. Diverse cuticular hydrocarbons from Australian canebeetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *Australian Journal of Entomology*, v. 47, n. 2, p 153-159, 2008.

FRANCKE, O. F.; STOCKWELL, S. A. *Scorpions (Arachnida) from Costa Rica*. Texas Tech University Press, Texas, 64p, 1987.

FOX, G. A.; COOPER, A. M.; HAYES, W. K.; The dilemma of choosing a reference character for measuring sexual size dimorphism, sexual body component dimorphism, and character scaling: cryptic dimorphism and allometry in the scorpion *Hadrurus arizonensis*. *Plos One*, v. 10(3), e0120392, 2015.

GAFFIN, D. G.; BROWNELL, H. P. Evidence of Chemical Signaling in the Sand Scorpion, *Paruroctonus mesaensis* (Scorpionida: Vaejovidae). *Ethology*, v. 91, p 59-69, 1992.

GAFFIN, D. G.; BROWNELL, H. P. Response properties of chemosensory peg sensilla on the pectines of scorpions. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 181, p 291-300, 1997a.

GAFFIN, D. G.; BROWNELL, H. P. Electrophysiological evidence of synaptic interactions within chemosensory sensilla of scorpion pectines. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 181, p 301-307, 1997b.

GARCIA, C. F.; OVIEDO-DIEGO, M.; LAINO, A.; PETERSON, G.; MATTONI, C. I.; PERETTI, A. V.; OJANGUREN-AFFILASTRO, A. A. Low temperatures induce physiological changes in lipids, fatty acids and hydrocarbons, in two rare winter scorpions of genus *Urophonius* (Scorpiones, Bothriuridae). *Journal of Thermal Biology*, v. 96, p. 102841, 2021.

GEFEN, E. Sexual dimorphism in desiccation responses of the sand scorpion *Smeringurus mesaensis* (Vaejovidae). *Journal of insect physiology*, v. 54, n. 5, p 798-805, 2008.

GEFEN, E.; TALAL, S.; BRENDZEL, O.; DROR, A.; FISHMAN, A. Variation in quantity and composition of cuticular hydrocarbons in the scorpion *Buthus occinatus* (Buthidae) in response to acute exposure to desiccation stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 182, p 58-63, 2015.

GEISELHARDT, S; OTTE, T; HILKER, M. The role of cuticular hydrocarbons in male mating behavior of the mustard leaf beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). *Journal of chemical ecology*, v. 35, n. 10, p 1162, 2009.

GUO, L.; BLOMQUIST, G. J. Identification, accumulation, and biosynthesis of the cuticular hydrocarbons of the southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 16, n. 1, p 19-30, 1991.

HADLEY, N. F.; JACKSON, L. L. Chemical composition of the epicuticular lipids of the scorpion, *Paruroctonus mesaensis*. *Insect Biochemical*, v. 7, p 85-89, 1977.

HADLEY, N. F.; HALL, R. L. Cuticular lipid biosynthesis in the scorpion, *Paruroctonus mesaensis*. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 212, p 373-379, 1980.

HALL, R. L.; HADLEY, N. F. Incorporation of synthesized and dietary hydrocarbons into the cuticle and hepatopancreas of the scorpion *Paruroctonus mesaensis*. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 224, p 195-203, 1982.

HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, v. 50, p 371-393, 2005.

LIMA, I. S.; HOUSE, P. E.; NASCIMENTO, R. R. D. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae): identification and behavioural activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 2, p 196-201, 2001.

LIRA, A. F. A.; DE SOUSA, A. M.; SILVA FILHO, A. A. C.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Spatio-temporal microhabitat use by two co-occurring species of scorpions in Atlantic rainforest in Brazil. *Zoology*, v. 116, p 182-185, 2013.

LIRA, A. F. A.; DE SOUZA, A. M. Microhabitat use by scorpion species (Arachnida: Scorpiones) in the montane Atlantic Rain Forest, Brazil. *Revista Ibérica de Aracnología*, v. 24, p 107-108, 2014.

LIRA, A. F. A.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Diversity of scorpions (Chelicerata: Arachnida) in the Atlantic Forest in Pernambuco, northeastern Brazil. *Check List*, v. 10, n. 6, p 1331-1335, 2014.

LIRA, A. F. A.; REGO, F. N. A. A.; ALBUQUERQUE, C. M. R. How important are environmental factors for the population structure of co-occurring scorpion species in a tropical forest? *Canadian Journal of Zoology*, v. 93, p 15-19, 2015.

LIRA, A. F. A.; DE SOUZA, A. M.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Report of intraguild predation and cannibalism in scorpions (Scorpiones: Buthidae) in the Brazilian Atlantic forest. *North-Western Journal of Zoology*, v. 13, n. 2, p 356, 2017.

LIRA, A. F. A.; PORDEUS, L. M.; REGO, A. A. N. F.; IANUZZI, K.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Sexual dimorphism and reproductive behavior in the Brazilian scorpion *Tityus pusillus* (Scorpiones: Buthidae). *Invertebrate Biology*, v. 137, n. 3, p 221-230, 2018.

LOURENÇO, W. R. Contribuição ao conhecimento sistemático e biológico de *Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones, Buthidae). *Revista Nordestina de Biologia*, v. 5, n. 1, p 35-43, 1982.

LOURENÇO, W. R. Scorpions of Brazil. Les Édition de l'If, Paris, p 308, 2002.

MARTIN, S. J.; VITIKAINEN, E.; HELANTERÄ, H.; DRIJFHOUT, F. P. Chemical basis of nest-mate discrimination in the ant *Formica exsecta*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 275, n. 1640, p 1271-1278, 2008.

MELVILLE, J. M.; TALLAROVIC, S. K.; BROWNELL, P. H. Evidence of mate trailing in the giant hairy desert scorpion, *Handrurus arizonensis* (Scorpionida, *luridae*). *Journal of Insect Behavior*, v. 16, n. 1, p 97-115, 2003.

MILLER, A. L.; FORMANOWICZ, D. R. Friend or foe: behavioral responses to conspecifics in the northern scorpion, *Paruroctonus boreus* (Scorpionida: *Vejovidae*). *Journal of Ethology*, v. 29, p 251-256, 2011.

NELSON, D. R.; BLOMQUIST, G. J. Insect waxes. *In Waxes: Chemistry, Molecular Biology, and Function*. Dundee, Scotland: The Oily Press, p 1-90, 1995.

NELSON, D. R.; OLSON, D. L.; FATLAND, C. L. Cuticular hydrocarbons of the flea beetles, *Aphthona lacertosa* and *Aphthona nigriscutis*, biocontrol agents for leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 133, n. 3, p 337-350, 2002.

NIST Webbok. National Institute of Standards and technology. <http://www.nist.gov/>. 2014.

OLIVERO, P. A.; MATTONI, C. I.; PERETTI, A. V. Differences in mating behavior between two allopatric populations of a neotropical scorpion. *Zoology*, v. 123, p 71-78, 2017.

PASK, G. M.; SLONE, J. D.; MILLAR, J. G.; DAS, P.; MOREIRA, J. A.; ZHOU, X.; BELLO, J.; BERGER, S. L.; BONASIO, R.; DESPLAN, C.; REINBERG, D.; LIEBIG, J.; ZWIEBEL, L. J.; ANANDASANKAR, R. Specialized odorant receptors in social insects that detect cuticular hydrocarbon cues and candidate pheromones. *Nature communications*, v. 8, n. 1, p 1-11, 2017.

PERETTI, V. A.; ACOSTA, L. E.; Sexual cannibalism in scorpions: fact or fiction? *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 68, p 485-496, 1999.

POLIS, G. A.; FARLEY, R. D.; Behavior and ecology of mating in the cannibalistic scorpion, *Paruroctonus mesaensis* Stahnke (Scorpionida: vaejovidae). *Journal of Arachnology*, v. 7, p 33-46, 1979.

POLIS, G. A. The effect of cannibalism on the demography and activity of a natural population of desert scorpions. *Behavioral ecology and sociobiology*, v. 7, n. 1, p 25-35, 1980.

POLIS, G. A.; SISSOM, W. D., Life history. *In*: POLIS, G. A. *The Biology of Scorpions*. Stanford University Press, v. 587, p 161-223, 1990.

PORDEUS, L. M.; LIRA, A. F. A.; ALBUQUERQUE, C. M. R. Male courtship behavior is triggered by female chemical cues in the scorpion *Tityus pusillus* Pocock, 1893 (Scorpiones: Buthidae). *Canadian Journal of Zoology*, v. 97, n. 12, p 1122-1125, 2019.

PORTO, T. J., CARVALHO, L. S., DE SOUZA, C. A. R., OLIVEIRA, U., & BRESCOVIT, A. D. Escorpiões da Caatinga: conhecimento atual e desafios. *Artrópodes do semi-árido: biodiversidade e conservação. Printmídia: Feira de Santana*, p 33-47, 2014.

REIN, J. O. *The Scorpion Files*. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. Available 2017.03.18 from <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>, 2017.

ROMERO-LEBRÓN, E., OVIEDO-DIEGO, M. A., ELIAS, D., VRECH, D. E., & PERETTI, A. V. Effect of the mating plug on female chemical attractiveness and mating acceptance in a scorpion. *Ethology*, v. 125, n. 4, p 184-194, 2019.

SHAHANDEH, M. P.; PISCHEDDA, A.; TURNER, T. L. Male mate choice via cuticular hydrocarbon pheromones drives reproductive isolation between *Drosophila* species. *Evolution*, v. 72, n. 1, p 123-135, 2018.

SPIEGEL, C. N.; DOS SANTOS DIAS, D. B.; ARAKI, A. S.; HAMILTON, J. G.; BRAZIL, R. P.; JONES, T. M.; The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. *Parasites & vectors*, v. 9, n. 1, p. 580, 2016.

STAFSTROM, J. A.; HEBETS, E. A.; Female mate choice for multimodal courtship and the importance of signaling background for selection on male ornamentation. *Current Zoology*, v. 59(2), p 200-209, 2013.

STEINMETZ, S. B.; BOST, K. C.; GAFFIN, D. D. Response of male *Centruroides vittatus* (Scorpiones: Buthidae) to aerial and substrate-borne chemical signals. *Euscorpius*, v. 2004, n. 12, p 1-6, 2004.

TAYLOR, M. S.; COSPER, C. R.; GAFFIN, D. D. Behavioral evidence of pheromonal signaling in desert grassland scorpions *Paruroctonus utahensis*. *Journal of Arachnology*, v. 40, n. 2, p 240-244, 2012.

THORNE, B. L.; HAVERTY, M. I.; COLLINS, M. S. Taxonomy and biogeography of *Nasutitermes acajutlae* and *N. nigriceps* (Isoptera: Termitidae) in the Caribbean and Central America. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, n. 6, p 762-770, 1994.

TOOLSON, E. C.; HADLEY, N. F. Seasonal effects on cuticular permeability and epicuticular lipid composition in *Centruroides sculpturatus* ewing 1928 (Scorpiones: Buthidae). *Journal of comparative physiology*, v. 129, n. 4, p 319-325, 1979.

TOOLSON, E. C. Interindividual variation in epicuticular hydrocarbon composition and water loss rates of the cicada *Tibicen dealbatus* (Homoptera: Cicadidae). *Physiological zoology*, v. 57, n. 5, p 550-556, 1984.

VANÍČKOVÁ, L.; SVATOŠ, A.; KROISS, J.; KALTENPOTH, M.; DO NASCIMENTO, R. R.; HOSKOVEC, M.; BŘÍZOVÁ, R.; KALINOVÁ, B. Cuticular hydrocarbons of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, n. 9, p 1133-1142, 2012.

WATSON, J. A. L.; BROWN, W. V.; MILLER, L. R.; CARTER, F. L.; LACEY, M. J. Taxonomy of *Heterotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in south-eastern Australia: cuticular hydrocarbons of workers, and soldier and alate morphology. *Systematic Entomology*, v.14, n. 3, p 299-325, 1989.

WILLEMART, R. H.; HEBETS, E. A.; Sexual differences in the behavior of the harvestman *Leiobunum vittatum* (Opiliones, Sclerosomatidae) towards conspecific cues. *Journal of Insect behavior*, v. 25, p 12-23, 2012.

XU, M.; LU, Z.; LU, Y. Y.; BALUSU, R. R.; AJAYI, O. S.; FADAMIRO, H. Y.; APPEL, A. G.; CHEN, L. Cuticular hydrocarbon chemistry, an important factor shaping the current distribution pattern of the imported fire ants in the USA. *Journal of insect physiology*, v. 110, p 34-43, 2018.

ZHANG, B.; XUE, H. J.; SONG, K. Q.; LIU, J.; LI, W. Z.; NIE, R. E.; YANG, X. K. Male mate recognition via cuticular hydrocarbons facilitates sexual isolation between sympatric leaf beetle sister species. *Journal of Insect Physiology*, v. 70, p 15-21, 2014.

ZHU, G. H.; YE, G. Y.; HU, C.; XU, X. H.; LI, K. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. *Medical and veterinary entomology*, v. 20, n. 4, p 438-444, 2006.