

Carolina Nisa Ramiro

**Caracterização química de secreções de glândulas
pré-anais e femorais de espécies brasileiras de
lagartos da família Teiidae (Squamata)**

Chemical characterization of secretions of preanal and femoral
glands of Brazilian species of lizards of the family Teiidae
(Squamata)

São Paulo

2019

Carolina Nisa Ramiro

**Caracterização química de secreções de glândulas
pré-anais e femorais de espécies brasileiras de
lagartos da família Teiidae (Squamata)**

Chemical characterization of secretions of preanal and femoral
glands of Brazilian species of lizards of the family Teiidae
(Squamata)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Doutor em Zoologia.

Orientador: Miguel Trefaut Rodrigues

Coorientador: Pedro Ismael da Silva Jr.

São Paulo

2019

Ramiro, Carolina Nisa

Caracterização química de secreções de glândulas pré-anais e femorais de espécies brasileiras de lagartos da família Teiidae (Squamata)

267 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Comunicação química. 2. Semioquímicos. 3. Lagartos neotropicais. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof.(a) Dr.(a).

Prof.(a) Dr.(a).

Prof.(a) Dr.(a).

Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues (Orientador)

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado (Processo 2015/12841-5), pela bolsa estágio de pesquisa no exterior (Processo 2017/19640-0) e pelo apoio financeiro ao Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular (Processo 2013/07467-1) do Instituto Butantan, fundamentais para a realização deste projeto, assim como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 472744/2012-7).

Agradeço ao Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues e ao Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Jr. por terem embarcado comigo neste projeto que era tão diferente de tudo o que vínhamos fazendo, pelo apoio, pelos ensinamentos e por serem exemplos de profissionais.

Agradeço ao Dr. José Martín por ter me recebido em seu país e por ter me ensinado tanto sobre o tema. Agradeço à Dra. Pílar López e ao Dr. Gonzalo Rodrigues por terem dedicado tempo ao meu projeto e me apresentado aos experimentos comportamentais. Agradeço ao técnico Márcio Nardelli por toda a ajuda na compreensão dos cromatogramas.

Agradeço aos meus amigos de laboratório por todas as conversas, discussões acadêmicas, dicas e, especialmente, pelas risadas e pela amizade. Agradeço aos meus amigos não herpetólogos por não se queixarem das conversas sobre calangos.

Agradeço à minha família, a de sempre e a que ganhei nos últimos anos por acreditarem sempre em mim e no meu trabalho. Agradeço ao Vinícius Primiani não apenas pelo apoio, mas especialmente por ter suportado a distância tantas vezes para que eu pudesse compreender melhor as “linguadas” dos lagartos.

Agradeço, mais uma vez, à Maria Auxiliadora Ribeiro (Dora), ao Niltom Ribeiro (Doga) e ao Nevitom Celso Rabelo (Nevinho) por representarem tão bem as pessoas incríveis que vivem no interior do nosso país e que sempre se mostram tão dispostas a ajudar cientistas perdidos em busca de calangos.

Índice

Introdução Geral	6
Capítulo 1. Variação na composição química da secreção de glândulas femorais de <i>Ameiva ameiva</i> (Squamata, Teiidae) em localidades da Amazônia e da Caatinga brasileira	20
Capítulo 2. Nova caracterização química da secreção glandular de <i>Salvator merianae</i> (Squamata, Teiidae)	63
Capítulo 3. Caracterização da secreção de glândulas femorais e reconhecimento químico em três espécies de <i>Ameivula</i> (Squamata, Teiidae) da Caatinga brasileira	94
Capítulo 4. Caracterização química da secreção de glândulas femorais de três espécies de <i>Kentropyx</i> (Squamata, Teiidae) da Amazônia brasileira	163
Capítulo 5. Dados preliminares sobre a composição química da secreção de glândulas femorais e pré-anais de espécies de Teiidae e Gymnophthalmidae	205
Discussão Geral e Conclusões	240
Resumo	249
Abstract	250
Referências Bibliográficas	251

Introdução Geral

Contexto teórico

Os animais estão constantemente interagindo com outros indivíduos, coespecíficos ou não, através da troca de informações de diferente natureza: visuais, auditivas, táteis, elétricas e químicas. A existência de estruturas que permitem a percepção de informações químicas é antiga na história evolutiva, sendo compartilhada por todos os organismos, incluindo as bactérias (WYATT, 2014a) e os animais utilizam os sentidos químicos nos mais diversos contextos. Pernilongos utilizam o dióxido de carbono liberado por mamíferos para localizar a fonte de alimento (WYATT, 2014a), fêmeas de aranhas podem utilizar informações químicas para avaliar o *status* de saúde de potenciais parceiros (GILBERT & UETZ, 2019), lobos utilizam informações químicas nas fezes para marcar território e acessar a idade dos indivíduos (MARTÍN *et al.*, 2010), serpentes utilizam informações químicas de coespecíficos que são melhores forrageadores para tomar decisões de forrageio (CLARK, 2007) e recentemente tem surgido mais evidências de interações químicas em aves (CARO & BALTHAZART, 2010).

Compostos químicos envolvidos na interação entre dois organismos são chamados genericamente de semioquímicos (NORDLUND & LEWIS, 1976). Feromônios são semioquímicos utilizados em interações intraespecíficas e evoluíram como sinais para a comunicação e aleloquímicos são semioquímicos utilizados em interações interespecíficas e seu uso como pista química não tem relação com a sua evolução (KARLSON & LUSCHER, 1959; NORDLUND & LEWIS, 1976; WYATT, 2014a). O estudo moderno das interações químicas (WYATT, 2010) teve início com a percepção da existência dos feromônios (KARLSON & LUSCHER, 1959) e, posteriormente, com a identificação do bombicol, o primeiro feromônio isolado do bicho da seda (BUTENANDT *et al.*, 1961). Sessenta anos se passaram desde a criação do termo feromônio e avanços metodológicos nos permitiram, não apenas identificar milhares de feromônios nos mais diversos grupos do reino animal, como ampliar nossa compreensão sobre seu funcionamento (WYATT, 2014a). Atualmente se sabe que os feromônios, não estão apenas restritos às interações intraespecíficas, como precisam causar uma reação específica no receptor como, por exemplo, um comportamento

estereotipado (WYATT, 2010), o que exige mais informações para determinar se um determinado semioquímico é ou não um feromônio. Diferente de outras modalidades sensoriais, a percepção de semioquímicos não depende de luminosidade e seus sinais podem permanecer no ambiente mesmo após a saída do emissor, o que é particularmente importante para animais que vivem de forma mais solitária (SYMONDS & ELGAR, 2008; MARTÍN & LÓPEZ, 2000; GILLAM, 2011; MARTÍN & LÓPEZ, 2012).

A ordem Squamata (serpentes, anfisbenas e lagartos) é uma das mais diversas radiações de vertebrados, apresentando 10.417 espécies (UETZ *et al.*, 2019). São animais tipicamente solitários (POUGH *et al.*, 2003) e o hábito de dardejar (movimentos sequenciais de extrusão e retração da língua) é uma de suas características mais marcantes (COOPER, 1994). Historicamente as filogenias de Squamata, baseadas em dados morfológicos, suportavam uma divisão entre os Iguania e os Scleroglossa, os últimos incluindo algumas famílias de lagartos, as serpentes e as anfisbenas (ESTES *et al.*, 1988; CONRAD, 2008; LOSOS *et al.*, 2012). Além das diferenças genéricas na morfologia, os dois grupos se diferenciavam pela modalidade sensorial mais explorada: para os Iguania os estímulos visuais teriam maior importância, enquanto para os Scleroglossa, seriam os sinais químicos. COOPER JR. (1996) realizou um trabalho de reconstrução da história evolutiva dos sentidos químicos em Squamata e recuperou a divisão observada nas filogenias morfológicas, porém PYRON e colaboradores (2013) realizaram a primeira grande filogenia molecular para os Squamata revelando uma topologia que não se enquadra com a perspectiva da importância das duas modalidades sensoriais (visual x química). Embora os dados moleculares indiquem relações filogenéticas novas, os termos Iguania e Scleroglossa ainda são utilizados por conveniência, pois permitem que os herpetólogos rapidamente pensem em uma série de características morfológicas e comportamentais.

Os Squamata, assim como a maioria dos vertebrados, apresentam três sistemas quimiossensoriais: sistema olfatório, papilas gustativas e sistema vomeronasal (COOPER JR. & BURGHARDT, 1990; POUGH *et al.*, 2003). Embora genericamente répteis apresentem papilas gustativas na boca e na faringe (KARDONG, 2008), a gustação é o sentido químico menos estudado (COOPER JR. & ALBERTS, 1990). Serpentes não apresentam papilas gustativas, o que permite a exclusão da relação entre

o comportamento de dardejar e a gustação (MORGANS & HEIDT, 1978). Papilas gustativas foram encontradas na maioria das famílias de lagartos, principalmente na língua, e parecem ser mais abundantes entre os Iguania (SCHWENK, 1985), mas a gustação não parece ser suficiente para gerar resposta lingual (dardejar) normal em resposta a novos ambientes e itens alimentares (GRAVES & HALPERN, 1990).

Apesar das similaridades entre os sistemas olfatório e vomeronasal, eles funcionam de formas distintas e não apresentam qualquer conexão, levando COOPER e BURGHARDT (1990) a fazer distinções teóricas entre vomerolfação e olfação e entre vomodor e odor. Os circuitos neurais do órgão vomeronasal e do sistema olfatório correm em paralelo (KARDONG, 2008), porém os nervos do sistema olfatório terminam nos bulbos olfatórios primários, ao passo que os do órgão vomeronasal terminam nos bulbos olfatórios acessórios (COOPER JR. & BURGHARDT, 1990). As células sensoriais do órgão vomeronasal projetam-se por meio de microvilosidades e as do sistema olfativo são ciliadas (KARDONG, 2008). O fluxo de ar que se dirige das narinas para os pulmões permite que o epitélio olfativo entre em contato com compostos químicos presentes no ar, já o órgão vomeronasal recebe compostos químicos presentes na língua e na mucosa oral (KARDONG, 2008). Em serpentes e, provavelmente, em lagartos, após o animal retrair a língua, ele não a encaixa diretamente nas aberturas do órgão vomeronasal, mas a esfrega contra as aberturas dos ductos e contra pequenas elevações posteriores ao órgão, direcionando assim os compostos químicos para o interior das cavidades do órgão vomeronasal (KARDONG, 2008).

Embora muitas linhagens de Squamata apresentem um sistema nasal bem desenvolvido, o olfato parece estar restrito a compostos de baixo peso molecular e elevada volatilidade (HALPERN & KUBIE, 1983) e, em muitas espécies, não parece ser crucial durante o forrageamento e na resposta a feromônios (COOPER JR., 1996). A principal hipótese da função do olfato em serpentes e lagartos seria a de detectar compostos voláteis desencadeando o aumento de dardejadas para obtenção de informações mais detalhadas de compostos de elevado peso molecular e menor volatilidade via vomerolfação (COWLES & PHELAN, 1958; DUVALL, 1981; COOPER JR., 1996 e 2007; FONT *et al.*, 2012). O órgão vomeronasal é mais desenvolvido em Squamata do que em qualquer outra linhagem de vertebrados (POUGH *et al.*, 2003; KARDONG, 2008) e por muitos anos foi considerado como uma estrutura especializada

na detecção de feromônios (BAXI *et al.*, 2006), mas dados revelam também o papel essencial da vomerolfação na detecção de pistas químicas de presas (COOPER JR. & ALBERTS, 1990) e de predadores (AMO *et al.*, 2004) que não podem ser consideradas feromônios (WYATT, 2014a).

Os trabalhos sobre interações químicas em Squamata, embora tenham se mostrado cada vez mais frequentes nos últimos anos, correspondem apenas a 1% de toda a produção científica na área de comunicação química (SYMONDS & ELGAR, 2008) e são basicamente de dois tipos (HOUCK, 2009): (1) comportamentais, que buscam validar as fontes de semioquímicos nas espécies e/ou compreender a função das informações químicas dentro de um determinado contexto social e (2) caracterização química das secreções, buscando determinar quais compostos químicos são utilizados como semioquímicos e como variam entre diferentes espécies ou entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Com base nos trabalhos já realizados, sabemos que lagartos possuem diversas fontes de semioquímicos e de potenciais feromônios (MARTÍN & LÓPEZ, 2011) associadas, principalmente, com a epiderme (WELDON *et al.*, 2008). De forma genérica, as fontes de semioquímicos em lagartos podem ser divididas em pele (superfície do corpo), fezes/cloaca e glândulas femorais e pré-anais (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010; MARTÍN & LÓPEZ, 2011).

A pele é a fonte de semioquímicos menos estudada em lagartos (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010; MARTÍN & LÓPEZ, 2011), ainda mais quando comparada com a quantidade de informações disponíveis para serpentes (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010). A pele de lagartos apresenta compostos lipídicos que são sequestrados de camadas mais internas da epiderme (MARTÍN & LÓPEZ, 2011) e a cromatografia líquida realizada para extratos da epiderme de 23 espécies de lagartos indicaram a presença de diferentes esteroides e ácidos graxos, além de variações interespecíficas na composição (WELDON & BAGNALL, 1987). Embora as informações sejam escassas, demonstram que os lipídios presentes na pele de lagartos apresentam mais funções do que apenas atuar como barreira para a perda de água (ROBERTS & LILLYWHITE, 1980). Em *Eublepharis macularis* (Eublepharidae) cromatografia gasosa com extratos da pele de machos e fêmeas adultos, revelou diferenças intersexuais significativas, principalmente em relação a presença/ausência de alguns esteroides (MASON & GUTZKE, 1990). Ainda no mesmo trabalho, os autores

demonstraram que o comportamento de machos é alterado por características da pele da fêmea; antes e após o período de troca de pele, machos reagem à fêmea realizando *displays* de corte, porém durante o período de troca de pele, reagem de forma agressiva.

As fezes contêm produtos dos sistemas digestivo e urinário e de glândulas cloacais; atuam como fonte de semioquímicos em algumas espécies de lagartos (LÓPEZ *et al.*, 1998; BULL *et al.*, 1999a e b; LABRA *et al.*, 2002; VALDECANTOS *et al.*, 2015) e podem funcionar como sinais visuais (DUVALL *et al.*, 1987; LÓPEZ *et al.*, 1998), assim como ocorre em mamíferos (MARTÍN *et al.*, 2010; LINKLATER *et al.*, 2013). Embora os dados que revelam fezes como fontes de semioquímicos sejam conhecidos há décadas (DUVALL *et al.*, 1987), pouco se sabe sobre o seu papel no comportamento social de lagartos e sobre a sua composição química. Machos jovens de *Iberolacerta monticola* (Lacertidae) são capazes de discriminar entre juvenis, fêmeas adultas e machos adultos apenas com base em informações químicas presentes nas fezes e evitam locais marcados por machos adultos, reduzindo o risco de encontros agonísticos e predação (MOREIRA *et al.*, 2008). Um experimento comportamental, excluindo o caráter visual das pelotas fecais, revelou que machos adultos de *Liolaemus tenuis* (Liolaemidae) utilizam as informações químicas presentes nas fezes para auto-reconhecimento (LABRA *et al.*, 2002). Em *Egernia striolata* (Scincidae) machos adultos são capazes de discriminar suas fezes das de coespecíficos (BULL *et al.*, 1999a) e não há evidência de que diferenças na dieta estejam influenciando nas respostas observadas (BULL *et al.*, 1999b). No trabalho de BULL e colaboradores (1999b) há indícios de que os semioquímicos presentes nas fezes compreendem compostos lipofílicos, uma vez que machos responderam às fezes quando dissolvidas em diclorometano, mas não o fizeram quando as fezes foram apresentadas dissolvidas em água. Há evidências de que machos de *Crotaphytus collaris* (Crotaphytidae), uma espécie de lagarto conhecida por sua acuidade visual, é capaz de detectar e discriminar coespecíficos apenas com base em informações químicas presentes nas fezes (WILGERS & HORNE, 2009).

A principal, e mais bem estudada, fonte de semioquímicos em lagartos são as glândulas femorais e pré-anais (pré-cloacais). Embora as glândulas femorais e/ou pré-anais estejam presentes em muitas famílias de lagartos e tenham sido utilizadas como caráter taxonômico desde Linnaeus, até o começo da década de 1990 pouco se sabia

acerca da sua composição química e do seu significado funcional (COLE, 1966; MADERSON & CHIU, 1970; ALBERTS, 1990; WELDON *et al.*, 1990). São estruturas homólogas, diferem apenas em relação à posição e são formadas por invaginações do extrato germinativo, produzem secreção holócrina, comunicam-se com o meio externo através de poros e sua posição ventral indica deposição passiva da secreção no substrato durante a locomoção (COLE, 1966; ALBERTS, 1990; IMPARATO *et al.*, 2007). Quando presentes, geralmente, machos e fêmeas apresentam poros femorais/pré-anais, porém há espécies nas quais são encontradas apenas nos machos (COLE, 1966). Mesmo em espécies nas quais as glândulas ocorrem em machos e fêmeas, usualmente machos apresentam glândulas mais desenvolvidas e a produção da secreção é estimulada por hormônios andrógenos (COLE, 1966; ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1992a; CHAMUT *et al.*, 2009). Em machos dominantes de *Iguana iguana* (Iguanidae), a atividade secretória (ALBERTS *et al.*, 1992a), assim como a composição da secreção (ALBERTS *et al.*, 1992b) apresentam variação sazonal e estão associadas aos níveis de testosterona no sangue e aumento do diâmetro dos poros. Glândulas femorais de machos de *Ctenophorus ornatus* (Agamidae) atrofiam após a castração dos indivíduos, porém voltam a apresentar atividade quando níveis de testosterona são recuperados de forma artificial (FERGUSSON *et al.*, 1985). Outro aspecto que está associado com o aumento de atividade glandular é o *status* reprodutivo, com aumento de produção da secreção durante a estação reprodutiva (COLE, 1966; ALBERTS, 1990). Este é um aspecto interessante, uma vez que grande parte da base teórica das glândulas femorais e pré-anais foi construída utilizando como modelos espécies de climas mais temperados e que apresentam reprodução sazonal bem marcada. Em *Ameiva ameiva*, um teiúdeo de ampla distribuição na América do Sul, machos e fêmeas adultos foram acompanhados pelo período de um ano e não foi observada variação significativa no desenvolvimento glandular e no diâmetro dos poros (IMPARATO *et al.*, 2007).

A composição química detalhada da secreção de glândulas femorais e pré-anais já foi estudada para algumas espécies de poucas famílias de lagartos, mas embora esteja claro que é composta por proteínas e lipídios, não se sabe qual composto ou combinação de compostos é mais relevante nas interações químicas entre indivíduos (ESCOBAR *et al.*, 2001). Dados indicam que as proteínas podem corresponder a até 80% do total da secreção (ALBERTS, 1990) e há variação na composição proteica entre indivíduos da mesma espécie e entre espécies (ALBERTS, 1990 e 1991; MANGIACOTTI *et al.*, 2017

e 2019). Em diferentes grupos animais, proteínas e peptídeos foram identificados como semioquímicos importantes em diversos contextos sociais (WYATT, 2014b), porém os estudos que caracterizaram as proteínas presentes nas secreções femorais e pré-anais de lagartos são raros (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Apesar dos trabalhos liderados por ALBERTS indicando variação na composição proteica das secreções e sua utilização em contextos sociais, por quase 30 anos o papel das proteínas foi negligenciado, sendo consideradas matriz não volátil que daria estabilidade para os compostos lipofílicos, considerados até então os verdadeiros semioquímicos (ESCOBAR *et al.*, 2003; MARTÍN & LÓPEZ, 2011; MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Em relação à composição lipofílica, as principais classes de compostos identificadas nas espécies estudadas foram cetonas, amidas, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos e, principalmente, esteroides (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010; MARTÍN & LÓPEZ, 2011) e até o momento não foram identificados indivíduos com padrões idênticos.

Estudos que tiveram início no final dos anos 1980 e que se estendem até os dias de hoje, além de caracterizarem quimicamente as secreções femorais e pré-anais, demonstraram o seu papel nos mais diferentes contextos sociais de lagartos e buscaram compreender quais fatores estão associados às diferenças observadas. Secreções femorais e pré-anais já foram testadas em contextos de marcação de território, escolha de parceiros durante a estação reprodutiva, reconhecimento específico (BARBOSA *et al.*, 2006), auto-reconhecimento, discriminação de indivíduos familiares e não familiares (ARAGÓN *et al.*, 2001; FONT & DESFILIS, 2002), isolamento reprodutivo (GABIROT *et al.*, 2013), identificação de complexos crípticos de espécies (GABIROT *et al.*, 2012; ZOZAYA *et al.*, 2019) e identificação do *status* de saúde e outras características de coespecíficos (CARAZO *et al.*, 2007; HEATHCOTE *et al.*, 2014; GARCÍA-ROA *et al.*, 2017; NISA *et al.*, 2019). Até o momento, diferentes fatores foram identificados influenciando diretamente a composição química das secreções das glândulas femorais e pré-anais, além de diferenças filogenéticas. Em *Podarcis muralis* (Lacertidae) foram encontradas diferenças significativas na composição química da secreção femoral entre machos com diferentes oportunidades de termorregulação e as fêmeas parecem ser capazes de discriminar, apenas com base em informações químicas, os machos com mais oportunidades (HEATHCOTE *et al.*, 2014). Machos de *Iberolacerta cyreni* (GARCÍA-ROA *et al.*, 2017) e de *I. monticola* (MARTÍN & LÓPEZ, 2006a) apresentam composição química diferente quando recebem suplemento de

vitaminas e as fêmeas, não apenas são capazes de discriminar entre secreções com diferentes quantidades de vitaminas, como demonstram maior interesse pela secreção de machos que receberam suplemento. BAECKENS e colaboradores (2017) comparando a composição química da secreção de dezenas de espécies de Lacertidae, encontraram correlações entre variáveis climáticas e composição química, com espécies de climas mais méxicos (mais úmidos e frios) apresentando maiores quantidades de aldeídos e álcoois de baixo peso molecular (mais voláteis) e espécies de climas mais xéricos (mais quentes e secos) apresentando maiores quantidades de ésteres de ácidos graxos e álcoois de elevado peso molecular (menos voláteis e mais estáveis).

É inegável o aumento da literatura sobre o papel das secreções femorais e pré-anais em aspectos da história de vida de lagartos, assim como a respeito de sua composição química, porém a extensa maioria dos trabalhos foi realizada para espécies do hemisfério norte, principalmente, entre representantes da família Lacertidae. Até onde sabemos, para a América do Sul há dados sobre a composição química das secreções femorais apenas para algumas poucas espécies de *Liolaemus* (LABRA *et al.*, 2001; ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003) e para *Salvator merianae* (Teiidae) (MARTÍN *et al.*, 2011). Atualmente no Brasil são encontradas 287 espécies de lagartos (UETZ *et al.*, 2019) e *S. merianae* é a única espécie que ocorre no país para a qual temos informações da composição química das secreções (MARTÍN *et al.*, 2011). Enquanto os dados de composição química são obtidos de animais de vida livre coletados durante a estação reprodutiva, as informações de *S. merianae* foram obtidas de machos adultos e reprodutivos mantidos em um cativeiro na Argentina e apresentaram um padrão único e discrepante do observado para todos os lagartos até então estudados, não apresentando colesterol (composto mais abundante na extensa maioria das espécie estudadas) e apresentando quantidades elevadas de ácidos graxos (MARTÍN *et al.*, 2011).

Os Teiidae são lagartos do Novo Mundo de tamanho corporal médio a grande, são diurnos e apresentam hábitos que variam entre o terrestre, arborícola e semi-aquático, são ovíparos e os hábitos alimentares são bastante variados (PIANKA & VITT, 2003). Das 161 espécies da família, 42 ocorrem no território brasileiro (UETZ *et al.*, 2019). Três extensos trabalhos buscaram compreender as relações filogenéticas existentes entre gêneros e espécies de Teiidae. Nem o trabalho de HARVEY e colaboradores (2012) com base em 137 caracteres morfológicos, nem os extensos

trabalhos moleculares de PYRON e colaboradores (2013) e GOICOECHEA e colaboradores (2016) foram capazes de solucionar todas as relações à nível genérico dentro da família, indicando a necessidade de novas fontes de informação. Algumas linhagens de Teiidae, principalmente os Teiinae, têm taxonomia bastante complexa, ocorrência de espécies híbridas e partenogenéticas e muitas espécies só muito recentemente foram nomeadas (PIANKA & VITT, 2003; GIUGLIANO *et al.*, 2007; ARIAS *et al.*, 2011; HARVEY *et al.*, 2012; ARIAS *et al.*, 2014). Os Teiidae, além da proximidade filogenética, são considerados equivalentes ecológicos dos Lacertidae (PIANKA & VITT, 2003), a família mais bem estudada do ponto de vista das interações químicas.

Face à necessidade de se conhecer a secreção de glândulas femorais e pré-anais em diferentes espécies de lagartos e à ausência de dados para espécies da América do Sul, procuramos investigar a composição química das secreções de espécies brasileiras de lagartos. Os Teiidae foram escolhidos como modelo por sua ampla diversidade e distribuição e por sua taxonomia complexa que se beneficiaria de novas fontes de informação, além de serem equivalentes ecológicos de Lacertidae e por abrigarem a única espécie que ocorre no Brasil para a qual se tem informações da composição lipídica das secreções. O objetivo geral deste trabalho é caracterizar e comparar a composição química de secreções de glândulas femorais e pré-anais de representantes de gêneros de Teiidae que ocorrem no Brasil, e assim (1) identificar os possíveis compostos químicos que sejam exclusivos de espécies e/ou de sexo e (2) comparar os compostos químicos obtidos em Teiidae com suas funções químicas apresentadas na literatura específica, (3) contribuindo para uma melhor compreensão da evolução da composição química das secreções entre os gêneros de lagartos da família.

Metodologia geral

Protocolo de remoção das secreções

A remoção da secreção das glândulas femorais e pré-anais é bastante simples uma vez que a secreção se apresenta como um cilindro (plugue) sólido que alcança o meio externo através de poros (COLE, 1966; ALBERTS, 1990) (**Figura 1**) e o mesmo protocolo vem sendo utilizado desde os trabalhos realizados na década de 1990. A

remoção da secreção costuma ser realizada em animais vivos e não gera danos físicos, permitindo que os indivíduos sejam liberados após o procedimento. Durante o desenvolvimento deste trabalho validamos a possibilidade de se obter material de indivíduos recém sacrificados com injeção de anestésico, que foram coletados durante viagens de campo realizadas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP) e que estavam sendo preparados para coleções zoológicas. Os dados obtidos destes indivíduos não apresentaram diferenças marcantes dos dados obtidos de outros indivíduos da mesma espécie que não foram sacrificados previamente à remoção da secreção. Ao se realizar a remoção da secreção de indivíduos recém sacrificados, deve-se apenas tomar cuidado para que não haja contato do anestésico com o cilindro de secreção, porém mesmo que ocorra contaminação, a lidocaína pode ser facilmente identificada no cromatogramas e retirada das análises.



Figura 1. Região femoral do membro posterior esquerdo de um macho adulto de *Ameivula pyrrhogularis*. A ponta da seta sólida indica a escama que contém o poro femoral pelo qual a secreção alcança o meio externo. As duas setas pontilhadas indicam o cilindro de secreção após se pressionar ao redor dos poros femorais.

A secreção foi removida pressionando ao redor dos poros com auxílio de uma pinça metálica limpa para evitar contaminação das amostras (ESCOBAR *et al.*, 2001;

MARTÍN & LÓPEZ, 2006a). Para evitar contaminação cruzada entre amostras de diferentes indivíduos, a pinça foi limpa (com formol 10% e álcool 100%) entre a obtenção da secreção de dois indivíduos diferentes e para evitar a contaminação por meio de compostos naturalmente presentes na pele humana o procedimento foi realizado com luvas. Plugues de um mesmo indivíduo foram armazenados em um mesmo microtubo específico para cromatografia gasosa (microtubo de vidro com tampa de teflon) e as amostras permaneceram em freezer a -20°C sem aplicação de solvente até o início das análises químicas.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Até 2017, com a publicação do trabalho de MANGIACOTTI e colaboradores, não havia na literatura uma metodologia clara e atual para a extração das proteínas das secreções de glândulas femorais e pré-anais de lagartos. O protocolo apresentado a seguir foi desenvolvido em 2015 com base no apresentado por ALBERTS (1990) e posteriormente comparado com o desenvolvido por de MANGIACOTTI e colaboradores (2017), do qual difere apenas em pequenos detalhes relacionados à rotina de laboratório.

As secreções femorais/pré-anais foram trituradas em 200 µL de acetonitrila 80% ácido trifluoracético 0,05% (ACN 80% TFA 0,05%) para extração ácida das proteínas. Após a trituração, as amostras permaneceram *overnight* no solvente a -20°C, que foi removido por centrifugação a vácuo (*Speed-Vac Savant*) para obtenção apenas da porção proteica. Os *pellets* proteicos foram dissolvidos em água ultrapura e o volume utilizado variou entre 50 µL e 500 µL, garantindo completa homogeneização da porção proteica. As amostras foram agitadas em vórtex por dois minutos e centrifugadas por cinco minutos a 20 mil xG. Após este procedimento, 1 µL de cada amostra foi analisado utilizando-se o equipamento *NanoDrop* (leitura em A205) para quantificação da concentração de proteína total e cálculo do volume necessário para obtenção de 50 µg de proteína (ALBERTS, 1990) em cada poço do gel. Antes da aplicação no gel, as amostras foram aquecidas a 90°C por cinco minutos em solução tampão (*sample-buffer*: 250 mM Tris-HCL pH 6,8; 300mM SDS; 1mM azul de bromofenol; 40% glicerol, 8% betamercaptoetanol) para linearização das proteínas.

Para a observação do padrão e concentração relativa de bandas proteicas, assim como para o cálculo do peso molecular de cada componente, foram realizadas corridas com géis de poliacrilamida SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) (LAEMMLI, 1970). As corridas foram realizadas em modo descontínuo com gel de empilhamento na concentração de 4,5% de poliacrilamida e o gel de corrida na concentração de 15%. Para a separação das amostras a fonte KASVI foi utilizada com voltagem fixa em 120 V por duas horas e com corrente crescente até 700 mA. Para a visualização das bandas, foi utilizado o corante *Comassie Blue* (45% metanol, 10% ácido acético, 3 mM *comassie brilliant blue R-250*), caso as bandas não fossem visualizadas era realizada uma segunda coloração com nitrato de prata (BASSAM *et al.*, 1991).

Os géis corados foram fotografados e para cada corrida foram obtidas as seguintes informações utilizando o programa PyElph (PAVEL & VASILE, 2012): (1) o peso molecular aproximado de cada banda, estimado através da migração das bandas presentes no marcador de peso molecular e (2) uma matriz com dados de presença/ausência de cada banda em cada amostra para avaliar o grau de similaridade entre diferentes amostras através da análise UPGMA (do inglês, *unweighted pair group method with arithmetic mean*). Devido à impossibilidade de identificação das proteínas, pela ausência de informações em bancos de dados, as bandas foram comparadas apenas pelo peso molecular (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Os padrões de bandas proteicas de cada espécie foram comparados de forma qualitativa com base na presença/ausência de bandas proteicas e nas diferenças de intensidade de cada uma dessas bandas, uma vez que foram aplicadas as mesmas quantidades de proteína total, variações na intensidade das bandas representam maior/menor quantidade de material na mesma.

Cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS)

Os plugues de cada indivíduo foram triturados em 150 µL de diclorometano (DCM) ou hexano, o que não inviabiliza a comparação dos resultados, pois os dois solventes têm características químicas similares para solubilizar compostos lipofílicos e são utilizados nos diferentes trabalhos publicados sobre o tema (KHANNOON *et al.*, 2011a; MARTÍN *et al.*, 2011). A escolha da metodologia para preparação das amostras e programação da CG-MS foi realizada com base no trabalho sobre a composição

química da secreção de *S. merianae*, único Teiidae para o qual se tem informações da composição lipídica das secreções (MARTÍN *et al.*, 2011). As secreções de Teiidae parecem bastante cerosas (IMPARATO *et al.*, 2007; CHAMUT *et al.*, 2009; MARTÍN *et al.*, 2011) e obtivemos melhores resultados para aquelas amostras que eram ativamente trituradas no solvente.

A solução (solvente + plugues triturados) foi agitada em vórtex por 30 minutos para completa homogeneização seguida por centrifugação de 5 minutos a 20 mil xG. Alíquotas de 2 µL de cada amostra foram injetadas no modo *splitless* utilizando hélio como gás portador a 30 cm/s, com temperatura de injeção de 280 °C. A rampa de temperatura utilizada foi a seguinte: 50 °C durante 5 minutos, depois ampliada para 300 °C a uma taxa de 5 °C/min e, finalmente, uma isotérmica de 315 °C por 10 minutos. A ionização foi realizada por impacto de elétrons (70 eV) a 250 °C. Parte das amostras foi analisada na Espanha durante estágio no exterior financiado pela FAPESP e parte foi analisada na Central Analítica do Instituto de Química da USP. Embora os equipamentos sejam de marcas diferentes, as colunas utilizadas foram equivalentes (composição da coluna: 5% fenil, 95% polidimetilsiloxano, 0,25x0,25), permitindo que os dados sejam analisados de forma conjunta e comparativa. O mesmo procedimento foi realizado apenas com solvente para identificação de potenciais contaminantes dos solventes e/ou microtubos.

A análise dos cromatogramas foi realizada no programa *GCMS Postrun Analysis* da GCMS Solutions®. Os picos, que representam os compostos lipofílicos, foram integrados manualmente, os compostos foram identificados com base na biblioteca *NIST14*, conferindo os respectivos espectros de massas e tempos de retenção (TR), as quantificações foram realizadas automaticamente pelo programa e representam a porcentagem relativa de cada composto em relação a corrente total de íons (TIC, do inglês *total ion current*). Só foram incluídos os compostos químicos identificados, pelo menos, ao nível de classe (aldeído, esteroide, cetona etc.).

Em todos os capítulos as comparações do padrão de compostos lipofílicos receberam o mesmo tratamento. Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa sobre presença/ausência de compostos em cada grupo analisado. Previamente às comparações estatísticas, para correção do problema de não-independência das porcentagens relativas à corrente total de íons (TIC), foi aplicada a seguinte relação: logaritmo natural

da porcentagem do composto/1 – porcentagem do composto (AEBISCHER *et al.*, 1993). Para explorar potenciais diferenças com base em todos os compostos lipofílicos identificados, foram realizadas análises multivariadas de variância permutacional (PERMANOVA) baseadas nas matrizes de distâncias euclidianas com 999 permutações (ANDERSON, 2001) e uma análise canônica de coordenadas principais (CAP, do inglês *canonical analysis of principal coordinates*) (ANDERSON & WILLIS, 2003).

Após essa exploração inicial, foram selecionados os compostos lipofílicos compartilhados por, pelo menos, três indivíduos de cada grupo a ser comparado. Essa seleção foi realizada visando testar diferenças nas porcentagens apenas dos compostos identificados no maior número de indivíduos porque (1) diferenças entre compostos exclusivos foram avaliadas de forma qualitativa, (2) compostos presentes em poucos indivíduos mostram grande variação interindividual, (3) buscamos por diferenças/similaridades nas porcentagens dos compostos lipofílicos que podem ser encontrados no maior número possível de indivíduos e (4) amostras com tamanho inferior à três não apresentam média e variação que possam ser testadas com análises estatísticas (ZAR, 2010). As porcentagens corrigidas de cada composto químico selecionado foram testadas para normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene) (ZAR, 2010). Para avaliar a ocorrência de diferenças nas porcentagens relativas de cada composto (GABIROT *et al.*, 2010), assim como entre classes de compostos, foi realizada a análise univariada de variâncias (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* de Tukey quando mais de dois grupos estavam sendo comparados (ZAR, 2010). Compostos que não apresentaram distribuição normal e/ou variâncias homogêneas foram comparados por Mann-Whitney, equivalente não paramétrico da ANOVA (ZAR, 2010). As porcentagens corrigidas foram utilizadas como variáveis em uma análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*), extraindo sempre o número mínimo de componentes principais responsáveis por aproximadamente 80% da variação entre as espécies (GABIROT *et al.*, 2010 e 2012; ZOZAYA *et al.*, 2019). Uma análise discriminante foi utilizada para avaliar se os compostos selecionados são úteis para predizer a origem da secreção (GABIROT *et al.*, 2010). As análises estatísticas foram realizadas no *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) e no *Paleontological Statistics* (PAST).

Capítulo 1

Variação na composição química da secreção de glândulas femorais de *Ameiva ameiva* (Squamata, Teiidae) em localidades da Amazônia e da Caatinga brasileira

Abstract. The femoral and preanal glands are the main source of semiochemicals in lizards and play an essential role in different social contexts. For chemical communication to be effective, scent marks must be durable. Semiochemicals present in lizards' secretions are influenced by climatic conditions, especially temperature and humidity, which reduce the efficiency of the scent marks. This problem can be circumvented by increasing the production of the secretion (pore number and/or diameter) and/or changing the chemical composition. *Ameiva ameiva* is a species of Teiidae with wide geographical range and an excellent model to contribute on the comprehension of the impact of different climatic conditions on the composition of the secretion in different populations of the same species, since *A. ameiva* occurs in such discrepant places as the Brazilian Caatinga and Amazônia. In this chapter we seek to characterize the femoral secretion of *A. ameiva* and look for differences that could be explained based on the climatic differences between Caatinga and Amazônia. The observed differences among females of *A. ameiva* seem to be more related to the reproductive status than to the morphoclimatic domain of origin. In males were identified 99 lipophilic compounds, there are significant differences in chemical composition and the discriminant and CAP analyzes correctly classified the origin of the individuals. Some aspects of the chemical composition of femoral secretions of males seem to be explained by behavioral aspects. Males from Amazônia showed higher amounts of squalene, cholest-4-en-3-one and cholesta-4,6-dien-3-one and these compounds are more resistant to oxidation that are more intense in locals with higher humidity.

Keywords. Interpopulational variation, lipophilic compounds, neotropical lizards, semiochemicals, signal efficacy.

Resumo. As glândulas femorais são a principal fonte de semioquímicos em lagartos e desempenham importante papel em diferentes contextos sociais. Para que a comunicação química seja efetiva, as marcações químicas precisam apresentar durabilidade. Os compostos químicos presentes nas secreções de lagartos sofrem influência de condições climáticas, principalmente temperatura e umidade, que reduzem a eficiência das marcações. Teoricamente, esse problema pode ser contornado através do aumento da produção de secreção (número e/ou diâmetro dos poros) e/ou por alterações na composição química. *Ameiva ameiva* é uma espécie de Teiidae com ampla distribuição geográfica e um ótimo modelo para avaliar o impacto de diferentes condições climáticas na composição da secreção de uma mesma espécie, uma vez que ocorre em locais tão discrepantes como a Caatinga e a Amazônia. Neste capítulo buscamos caracterizar a secreção de glândulas femorais de *A. ameiva* e buscamos por diferenças que pudessem ser explicadas com base nas diferenças climáticas entre a Caatinga e a Amazônia. Diferenças observadas em fêmeas de *A. ameiva* parecem ter maior relação com o estado reprodutivo do que com o domínio morfoclimático de origem. Nos machos foram identificados 99 compostos lipídicos, há variações significativas na composição química e as análises classificaram corretamente o domínio de origem dos indivíduos. Alguns aspectos da composição química das secreções femorais de machos de *A. ameiva* parecem ser explicados por aspectos comportamentais. Machos da Amazônia apresentaram maiores quantidades de esqualeno, cholest-4-en-3-one e cholesta-4,6-dien-3-one, compostos mais resistentes à oxidação.

Palavras-chave. Compostos lipofílicos, eficiência do sinal, lagartos neotropicais, semioquímicos, variação interpopulacional.

Introdução

A comunicação química é um aspecto essencial das interações sociais dos Squamata e os compostos químicos utilizados nessas interações são chamados de semioquímicos (JOHANSSON & JONES, 2007; MASON & PARKER, 2010; WYATT, 2014b). A principal fonte de semioquímicos em lagartos são as glândulas femorais e

pré-anais, que são consideradas estruturas homólogas (COLE, 1966; ALBERTS, 1990). A secreção dessas glândulas é sólida, projetando-se ao meio externo como cilindros através de poros e sua produção é influenciada por hormônios andrógenos e apresenta aumento significativo durante a estação reprodutiva (COLE, 1966; ALBERTS, 1990). Diferentes estudos revelaram que as secreções dessas glândulas são importantes em vários contextos sociais como, por exemplo, escolha de parceiros (JOHANSSON & JONES, 2007; MASON & PARKER, 2010; GABIROT *et al.*, 2013), para acessar a habilidade de luta ou *status* de dominância entre machos (LÓPEZ & MARTÍN, 2002) e para acessar informações de sexo, idade e saúde do emissor (LÓPEZ & MARTÍN, 2005a; MARTÍN & LÓPEZ, 2006b; MARTÍN *et al.*, 2007).

Para que a comunicação química seja efetiva, principalmente no que diz respeito a marcações no substrato, o sinal precisa apresentar durabilidade (ALBERTS, 1989; BAECKENS *et al.*, 2015). Após liberados os compostos químicos presentes nas secreções estão sujeitos à interferência de condições ambientais como, por exemplo, temperatura, umidade e pressão (BOSSERT & WILSON, 1963), que podem alterar suas características químicas e reduzir sua durabilidade. Estudos teóricos indicam que a seleção natural agiria de forma distinta em ambientes com condições climáticas divergentes, agindo no sentido de maximizar a eficiência do sinal (ALBERTS, 1992), porém poucos estudos práticos foram realizados para validar essa hipótese (BAECKENS *et al.*, 2015). Em ambientes de elevada umidade, pode haver aumento da oxidação dos compostos presentes nas secreções (ALBERTS, 1992), e a precipitação pode “lavar” as marcações químicas presentes no substrato (BAECKENS *et al.*, 2017). O aumento de temperatura interfere não apenas na durabilidade do sinal, com maiores índices de volatilidade, como também pode interferir negativamente na capacidade da informação ser detectada e parece ter maior influência em espécies que naturalmente habitam localidades mais frias (MARTÍN *et al.*, 2013).

Há duas formas já demonstradas pelas quais os lagartos podem aumentar a efetividade do sinal, minimizando o efeito das condições climáticas sob as secreções femorais: (1) alteração da composição química e/ou (2) aumento da produção de secreção. Em ambos os casos, deve-se ter cuidado ao analisar as diferenças encontradas entre populações ou espécies, pois alterações na composição química, assim como no número de poros femorais podem ser reflexo apenas de variabilidade genética, não

existindo uma explicação adaptativa para tais diferenças (MARTÍN *et al.*, 2015a). A primeira forma de aumentar a efetividade do sinal, através da alteração da composição química da secreção, já foi avaliada entre diferentes populações de uma mesma espécie e mesmo entre espécies diferentes. Em Lacertidae há genericamente uma correlação entre as condições climáticas e algumas classes de compostos presentes nas secreções, com espécies de clima mais quente e seco apresentando maior porcentagem de álcoois de alto peso molecular e ésteres de ácidos graxos e menor diversidade de compostos e espécies de climas mais frios e úmidos apresentando maior quantidade de aldeídos, álcoois de cadeia curta e diversidade de compostos (BAECKENS *et al.*, 2017). As diferenças na composição das secreções de *Podarcis hispanica* e *P. atrata* (Lacertidae) também parecem, ao menos em parte, ser explicadas por diferenças climáticas (GABIROT *et al.*, 2010). *Podarcis carbonelli*, que habita locais mais xéricos, apresentou maiores quantidades de ésteres de ácidos graxos e *P. bocagei*, que habita locais mais métricos, apresentou maior quantidade de esqualeno (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a). Enquanto a primeira espécie apresentou maior porcentagem de uma classe de compostos de menor volatilidade em condições de elevada temperatura, a segunda apresentou grandes quantidades de um composto que evita a oxidação dos demais compostos em ambientes mais úmidos (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a).

Como cada glândula femoral está associada a um único poro femoral (COLE, 1966), o aumento do número de poros femorais é um indicativo direto do aumento de glândulas e, conseqüentemente, de produção de secreção (ESCOBAR *et al.*, 2001; IRAETA *et al.*, 2011). Teoricamente, a maior produção de secreção aumenta o número de cópias da informação disponível no meio, aumentando a efetividade das marcações sob condições climáticas desfavoráveis (ESCOBAR *et al.*, 2001). Um estudo realizado com machos de *Psammodromus algirus* (Lacertidae) mostrou que o número de poros femorais, constante ao longo da vida do indivíduo, não tem correlação com o tamanho do membro e machos de populações em altitudes inferiores apresentam poros maiores, indicando que o aumento de produção de secreção na espécie parece estar associado com o aumento da efetividade dos sinais em ambientes mais quentes e secos (IRAETA *et al.*, 2011). Inicialmente foi identificada uma relação entre o número de poros e as condições climáticas em 20 espécies de *Liolaemus* (Liolaemidae), com espécies em locais com temperaturas mais elevadas, vento e baixa pressão atmosférica apresentando maior número de poros, produzindo mais secreção e minimizando os efeitos negativos

da volatilidade dos compostos (ESCOBAR *et al.*, 2001). Um segundo estudo, realizado com 102 espécies do gênero e levando em consideração a filogenia, encontrou uma inércia filogenética para o número de poros, com espécies filogeneticamente distantes e ocupando ambientes similares, apresentando diferenças significativas no número de poros (PINCHEIRA-DONOSO *et al.*, 2008). BAECKENS e colaboradores (2015) buscando realizar um trabalho similar com 162 espécies de Lacertidae, falharam em encontrar relação entre as condições climáticas e o número de poros femorais, mas encontraram relação entre o número de poros e o tipo de substrato.

Ameiva ameiva é uma espécie de Teiidae para a qual são reconhecidas três subespécies com base em caracteres morfológicos (HARVEY *et al.*, 2012), porém até onde temos conhecimento, não há estudos genéticos amplos comparando a divergência molecular entre diferentes populações e a história taxonômica da espécie é considerada caótica (UGUETO & HARVEY, 2011). A espécie apresenta distribuição bastante ampla, ocorrendo da América Central até a porção norte da Argentina e com populações introduzidas no sul da Flórida nos Estados Unidos (UGUETO & HARVEY, 2011), costuma ser abundante em seus locais de ocorrência e tem elevada tolerância a permanecer em ambientes alterados pela ação humana (VITT & COLLI, 1994; SARTORIUS *et al.*, 1999). É um lagarto relativamente grande com marcado dimorfismo sexual de tamanho e em coloração, com machos maiores e com colorido azul e verde quando adultos. *Ameiva ameiva* é um forrageador ativo que retorna para sua toca durante a noite e em momentos do dia sem boas condições para termorregulação e os machos apresentam comportamento bastante agressivo e territorial (VITT & COLLI, 1994). Por se tratar de um elemento conspícuo da herpetofauna onde ocorre e por sua ampla distribuição geográfica, *A. ameiva* é um excelente modelo para estudos diversos, principalmente no que se refere a trabalhos ecológicos comparativos que buscam identificar diferenças interpopulacionais (VITT, 1982; COLLI, 1991; VITT & COLLI, 1994; SARTORIUS *et al.*, 1999; ROCHA, 2008). Embora sempre ocorra em áreas abertas, *A. ameiva* pode ser encontrada em áreas com condições climáticas bastante distintas, como é o caso da Caatinga e da Amazônia, e essas diferentes condições ambientais parecem afetar aspectos da biologia da espécie (VITT & COLLI, 1994).

Machos e fêmeas de *A. ameiva* apresentam entre 30 e 45 poros femorais totais (HARVEY *et al.*, 2012) e a anatomia interna das glândulas corresponde ao modelo

genérico para lagartos com glândulas achatadas e ramificações que se unem a um ducto único levando a secreção para o meio externo (IMPARATO *et al.*, 2007). As glândulas femorais de *A. ameiva*, assim como em outros lagartos, são holócrinas, e a secreção se apresenta como um plugue sólido de coloração amarelada, que atinge o meio externo através da pressão provocada pela proliferação (IMPARATO *et al.*, 2007). Dados histoquímicos indicam que a secreção femoral de *A. ameiva* é formada por proteínas, provavelmente glicoproteínas, e lipídios (IMPARATO *et al.*, 2007). Um interessante aspecto dos plugues de *A. ameiva* é a presença de uma camada externa formada pelo acúmulo de células epiteliais descamadas que atuam na coesão das células que formam o plugue e no prolongamento da efetividade das informações químicas evitando rápida volatilização dos semioquímicos presentes na secreção (IMPARATO *et al.*, 2007). Ao contrário do observado na extensa maioria dos lagartos, nos quais as secreções femorais são depositadas no substrato de forma passiva durante a locomoção, em *A. ameiva* durante a locomoção do animal os plugues não estão em contato com o substrato e a fragmentação ocorre de forma natural como consequência do arranjo celular e da ausência de camadas de queratinócitos (IMPARATO *et al.*, 2007).

IMPARATO e colaboradores (2007) acompanharam o desenvolvimento dos poros femorais de 14 fêmeas e 14 machos adultos de *A. ameiva* durante um ano em cativeiro. Machos e fêmeas adultos não apresentaram diferenças significativas no número ou no diâmetro dos poros femorais e não foi observada variação no diâmetro dos poros ao longo dos meses, mesmo que cópulas fossem frequentemente observadas ao longo do ano. A ausência de dimorfismo sexual levou os autores à hipótese de que na espécie, machos e fêmeas utilizam as secreções femorais para marcar o substrato, determinando seus territórios e transmitindo informações a coespecíficos. Embora não existam trabalhos relatando experimentos comportamentais de interações químicas entre indivíduos de *A. ameiva*, há dados indicando que os indivíduos da espécie são capazes de discriminar quimicamente presas (grilos) de vegetais, água e colágeno, assim como outras espécies insetívoras de Teiidae e Lacertidae (COOPER JR. *et al.*, 2002). Uma das hipóteses levantadas por pesquisadores ao registrarem um caso de necrofilia na espécie evoca a percepção de pistas químicas (COSTA *et al.*, 2010). Um macho de *A. ameiva* foi observado tentando copular com uma fêmea morta, durante a tentativa, outro macho adulto se aproxima, interrompendo a cópula e gerando uma breve disputa pela fêmea. Após a observação, os pesquisadores coletaram a fêmea e observaram a presença de

folículos em vitelogênese secundária. Uma das explicações para o comportamento dos dois machos seria a presença de uma trilha de informações químicas liberada pela fêmea durante sua locomoção, indicando seu *status* reprodutivo, que teria sido seguida pelos dois machos e outros fatores (temperatura corporal, por exemplo) justificariam a não percepção de que a fêmea estava morta.

As poucas informações disponíveis para *A. ameiva* tornam a espécie um interessante modelo para estudos de caracterização química das secreções femorais. A espécie compartilha similaridades na morfologia das glândulas com *Salvator merianae* (CHAMUT *et al.*, 2009), há indícios de que a comunicação química seja um importante aspecto das interações sociais desses lagartos (IMPARATO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010) e apresenta distribuição extremamente ampla na América do Sul, ocorrendo em ambientes com condições climáticas bastantes distintas (VITT & COLLI, 1994). Com base no exposto, o presente trabalho tem como principais objetivos (1) caracterizar a secreção de glândulas femorais de *A. ameiva* obtidas na Caatinga e na Amazônia e (2) buscar por diferenças que possam ser explicadas com base nas diferenças climáticas observadas entre esses dois domínios morfoclimáticos, aumentando as informações sobre a química das glândulas femorais de espécies de lagartos que ocorrem no Brasil e a compreensão dos aspectos potencialmente envolvidos na diversidade química observada entre diferentes espécies de lagartos. Pelas condições climáticas genéricas dos dois domínios morfoclimáticos e pelo apresentado na literatura para outras famílias de lagartos acerca da influência das condições climáticas na composição da secreção, nossas hipóteses a serem testadas são: (1) indivíduos provenientes da Amazônia apresentarão maiores quantidades de compostos resistentes à oxidação e (2) indivíduos provenientes da Caatinga apresentarão maiores quantidades de compostos de elevado peso molecular e/ou maior produção de secreção, contornando as elevadas taxas de volatilidade.

Materiais e Métodos

Amostragem

No total, foram obtidas amostras de secreção de glândulas femorais de 16 indivíduos adultos de *Ameiva ameiva* (**Figura 1**). Do domínio morfoclimático da Amazônia foram obtidas amostras de sete machos e três fêmeas (Licença: SISBIO 30309-8) e da Caatinga, seis machos e duas fêmeas (Licença: SISBIO 54599-3) (**Tabela 1**).



Figura 1. Macho (esquerda) e fêmea (direita) adultos de *Ameiva ameiva*. Imagens: Mauro Teixeira Junior.

As amostras da Caatinga de março de 2017, foram obtidas de indivíduos posteriormente preservados que receberam numeração de campo (MTR) e as amostras de março de 2019 de indivíduos que foram liberados em seus respectivos pontos de captura após remoção da secreção. As amostras da região do Pico da Neblina (Maturacá) foram obtidas em novembro de 2017, as da região do Rio Negro (Santa Helena) em abril de 2018 e as da região do Rio Içá (Cachoeirinha) em abril de 2015. Para todos os indivíduos coletados a sexagem foi realizada através da inspeção das gônadas e para os indivíduos da Caatinga não coletados a sexagem foi realizada em campo através da eversão do hemipênis.

Tabela 1. Lista dos espécimes de *Ameiva ameiva* dos quais foi obtida secreção femoral. Para cada indivíduo é apresentado o domínio morfoclimático, número de registro de campo (MTR) para aqueles que foram coletados, a localidade, o sexo, o comprimento rostro-cloacal (CRC) em centímetros, o número total de poros femorais e por qual metodologia foi analisada sua secreção. CG: cromatografia gasosa e espectrometria de massas. GEL: eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

domínio	MTR	Localidade	sexo	CRC	POROS	CG	GEL
Amazônia	40030	Maturacá, AM	M	15,9	40	X	X
Amazônia	40003	Maturacá, AM	F	10,9	40	X	-
Amazônia	39805	Maturacá, AM	M	14,3	38	X	X
Amazônia	40206	Maturacá, AM	M	16,5	38	X	X
Amazônia	40516	Santa Helena, AM	F	14,09	36	X	-
Amazônia	40547	Santa Helena, AM	F	12,2	34	X	-

Amazônia	40725	Santa Helena, AM	M	11,42	38	X	-
Amazônia	41347	Boa Vista, AM	M	15	42	X	X
Amazônia	36230	Cachoerinha, AM	M	16	40	-	X
Amazônia	36245	Cachoerinha, AM	M	11,5	39	-	X
Caatinga	39526	Coronel José Dias, PI	F	12,6	41	X	X
Caatinga	39578	Coronel José Dias, PI	M	13,1	42	X	X
Caatinga	39643	Coronel José Dias, PI	F	13,6	39	X	X
Caatinga	-	Coronel José Dias, PI	M	13,5	41	X	-
Caatinga	-	Coronel José Dias, PI	M	12,5	42	X	-
Caatinga	-	Coronel José Dias, PI	M	16	41	X	-
Caatinga	-	Coronel José Dias, PI	M	16	40	X	-
Caatinga	-	Coronel José Dias, PI	M	13	39	X	-

Caracterização Climática

A Caatinga e a Amazônia são dois domínios morfoclimáticos com características climáticas contrastantes. A Amazônia, localizada na região norte do Brasil, apresenta clima quente e úmido e formações florestais densas (HIJMANS *et al.*, 2005). A Caatinga tem clima semiárido com temperatura elevada, precipitação anual baixa e regime de chuvas irregular (NIMER, 1989). Foram selecionadas oito variáveis climáticas para comparar as condições gerais de temperatura e umidade dos dois domínios morfoclimáticos: (1) BIO1 – média anual de temperatura, (2) BIO4 – sazonalidade da temperatura, (3) BIO5 – temperatura máxima do mês mais quente, (4) BIO6 – temperatura mínima do mês mais frio, (5) BIO12 – precipitação anual, (6) BIO13 – precipitação no mês mais úmido, (7) BIO14 – precipitação no mês mais seco e (8) BIO15 – sazonalidade da precipitação. Os dados foram obtidos do banco de dados do “*WorldClim – Global Climate Data*” (Disponível em: <https://www.worldclim.org>) (HIJMANS *et al.*, 2005), que apresenta informações compiladas mensalmente entre 1950 e 2000. Para evitar que os dados tivessem forte correlação geográfica, foram selecionadas quadrículas de 0,5° que abrangessem as localidades amostradas (Amazônia: Maturacá, Santa Helena e Boa Vista e Caatinga: Coronel José Dias) e obtidas as médias de cada uma das variáveis para os 50 anos de informações disponíveis.

Análise Química das Secreções

A extração da secreção, sua preparação e a realização da cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS) seguiram o exposto na METODOLOGIA GERAL. Para algumas amostras, após a realização da CG-MS, a sobra das amostras dissolvidas em solvente foram transferidas para microtubos de 500 µL e o solvente foi removido por centrifugação a vácuo (*Speed-Vac Savant*). O material obtido seguiu a metodologia de extração de proteínas com acetonitrila 80% ácido trifluoracético 0,05% apresentada na METODOLOGIA GERAL.

Análise estatística

Os dados climáticos foram inicialmente explorados com a análise de componentes principais (PCA) para visualização da variação climática entre a Amazônia e a Caatinga. Os dados foram transformados em seu logaritmo decimal e foi testada a normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variâncias (Levene) (ZAR, 2010). As diferenças entre os dois domínios foram testadas por ANOVA, quando respeitadas as premissas de distribuição normal e homogeneidade de variâncias dos dados, e por Mann-Whitney, quando não respeitadas essas premissas (ZAR, 2010).

Face à ausência de dimorfismo sexual no número de poros femorais em *A. ameiva* (IMPARATO *et al.*, 2007), o teste para verificar se há variação no número total de poros femorais (POR) entre indivíduos da Caatinga e da Amazônia foi realizado excluindo sexo como um fator. O número de poros apresentou distribuição normal (Shapiro-Wilk: $p > 0,1$) e homogeneidade de variâncias (Levene: $p = 0,17$). A comparação do número de poros femorais totais foi realizada através da análise de variâncias (ANOVA) (ZAR, 2010).

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa sobre presença/ausência de compostos lipofílicos em machos e fêmeas provenientes de cada um dos domínios morfoclimáticos. Pelo baixo número de fêmeas, não foi possível realizar análises estatísticas para comparações intersexuais e entre fêmeas da Caatinga e da Amazônia. Embora não tenha sido possível realizar análises estatísticas nessas comparações, foram apontadas, quando existentes, diferenças significativas nas porcentagens relativas à corrente total de íons (TIC) de compostos lipídicos. Para explorar potenciais diferenças

nas secreções de machos entre os dois domínios morfoclimáticos baseadas nas TIC foram realizadas as análises estatísticas apresentadas na METODOLOGIA GERAL.

Resultados

A média e o desvio padrão das variáveis climáticas são apresentados na **Tabela 2**. As variáveis climáticas BIO1 (Shapiro-Wilk: $p = 0,005$) e BIO14 (Shapiro-Wilk: $p = 0,001$) não apresentaram distribuição normal e BIO4, BIO6 e BIO15 não apresentaram variâncias homogêneas (Levene: $p = 0,001$). A única variável que não apresentou diferença estatística entre os dois domínios morfoclimáticos foi a média da temperatura anual (BIO1) (Mann-Whitney: $U = 0,3$). A PCA indicou que as variáveis ambientais, com exceção da BIO1, apresentam forte correlação entre elas. Os dois primeiros componentes principais explicaram 93,37% da variação climática entre os dois domínios (**Figura 2**). O PC1 separou completamente os dois domínios, indicando que a Caatinga apresenta menores índices de precipitação e temperatura mínima do mês mais frio e maior sazonalidade de temperatura e precipitação, assim como a temperatura máxima do mês mais quente.

Tabela 2. Média \pm desvio padrão (SD) das oito variáveis climáticas obtidas de cada um dos dois domínios climáticos estudados (Amazônia e Caatinga). BIO1: média anual de temperatura ($^{\circ}\text{C}$). BIO4: sazonalidade da temperatura (medida pelo desvio padrão). BIO5: temperatura máxima do mês mais quente ($^{\circ}\text{C}$). BIO6: temperatura mínima do mês mais frio ($^{\circ}\text{C}$). BIO12: precipitação anual (mm). BIO13: precipitação no mês mais úmido (mm). BIO14: precipitação no mês mais seco (mm). BIO15: sazonalidade da precipitação (medida pelo desvio padrão).

		Amazônia	Caatinga
BIO1	Média	26,69	26,51
	SD	0,38	0,41
BIO4	Média	0,4	0,85
	SD	1,11	0,59
BIO5	Média	32,3	34,8
	SD	0,56	0,45
BIO6	Média	21,3	17,8
	SD	0,37	0,82
BIO12	Média	2203	745
	SD	369,32	86,67

BIO13	Média	319,95	145,9
	SD	33,8	19,34
BIO14	Média	77,04	0,9
	SD	40,22	0,73
BIO15	Média	0,48	0,87
	SD	1,9	0,02

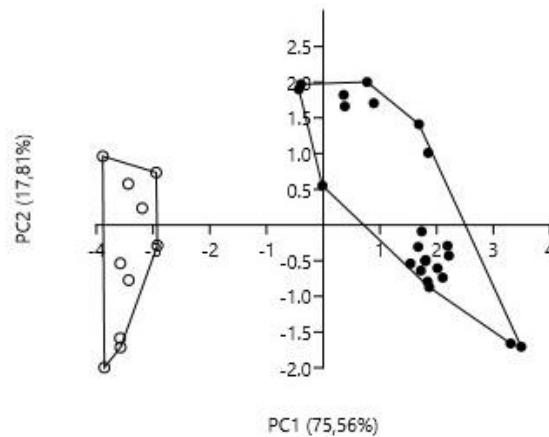


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação climática entre Caatinga (círculos abertos) e Amazônia (círculos fechados) com base em oito variáveis de temperatura e umidade.

A média \pm o desvio padrão do CRC nos indivíduos coletados na Amazônia foi $14,62 \pm 1,97$ cm para os machos e $12,39 \pm 1,6$ cm para as fêmeas. Para os indivíduos da Caatinga, os machos apresentaram CRC igual a $14,01 \pm 1,56$ cm e as fêmeas $13,56$ cm e $12,57$ cm. Os indivíduos da Caatinga apresentaram $40,63 \pm 1,18$ poros femorais totais e os indivíduos da Amazônia apresentaram $38,25 \pm 2,49$ e há diferença estatística significativa entre as duas localidades (ANOVA: $F_{1,16} = 5,91$ e $p = 0,03$) (**Figura 3**).

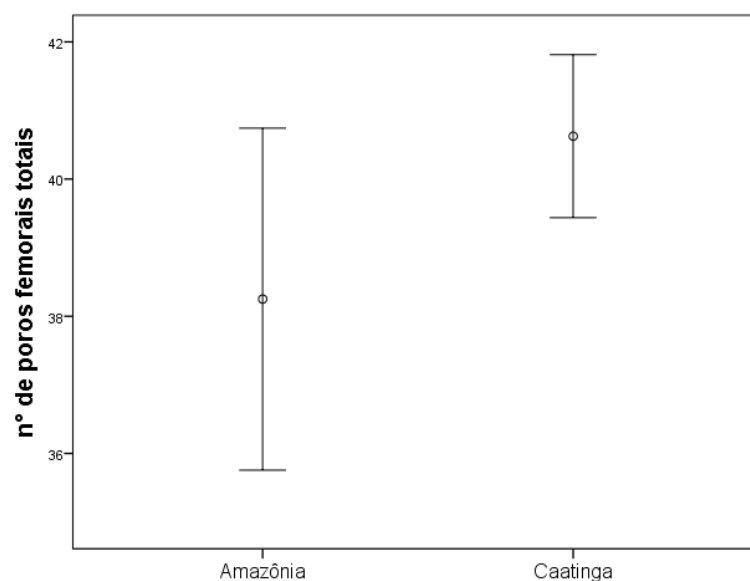


Figura 3. Média \pm desvio padrão do número de poros femorais totais dos indivíduos de *Ameiva ameiva*, separados pelos domínios morfoclimáticos de origem das amostras.

Compostos lipofílicos: Caatinga

Setenta e cinco compostos lipofílicos foram identificados em amostras de secreção femoral de oito indivíduos adultos de *Ameiva ameiva* da Caatinga (**Tabela 3**): nove aldeídos, três álcoois, 14 ésteres de ácidos graxos, três cetonas, 11 ácidos graxos, a 13-Docosenamida, duas formas do tocoferol, 31 esteroides e o esqualeno. Vinte e dois compostos foram identificados tanto em fêmeas quanto em machos (um aldeído, uma amida, o esqualeno, dois ésteres e 17 esteroides), porém apenas nove foram identificados em todos os indivíduos. Esses nove compostos representaram 61,6% e 83,71% da secreção femoral das duas fêmeas e entre 15,09% e 20,06% da secreção de machos.

Tabela 3. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreção femoral de fêmeas e machos adultos de *Ameiva ameiva* do domínio morfoclimático da Caatinga. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. Para as fêmeas os dados são apresentados de maneira individual (♀1: MTR 39526 e ♀2: MTR 39643) e para os machos é apresentada a média e o desvio padrão (SD) das seis amostras.

TR	Compostos	TIC (%)			
		♀1	♀2	♂ Média	SD
4.0	Hexanal	-	-	0,01	0,01
4.2	Hexanol	-	-	0,02	0,02
12.4	4-Nonenal	-	-	0,01	0,01
15.8	4-Decenal	0,11	-	0,01	0,02
18.7	2,4-Decadienal	-	-	0,01	0,02
24.2	Tridecanal	0,42	-	-	-
26.9	Éster não identificado do Ácido Decanóico	-	-	0,02	0,04
28.5	Tetradecanona	1,92	-	-	-
29.8	Ácido Tridecanóico	-	-	0,02	0,05
30.0	Ácido Tetradecanóico	-	-	0,17	0,10
31.0	Hexadecanal	-	-	0,07	0,09
31.2	Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	0,28	-	-	-
32.4	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	-	-	0,01	0,01
32.8	Ácido Pentadecanóico	-	-	0,03	0,03
33.7	Pentadecanona	1,04	-	-	-
34.1	Heptadecanal	-	-	0,01	0,01
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	1,44	-	0,03	0,02

34.6	Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	1,16	0,38
35.1	9-Octadecenal	-	-	0,17	0,16
35.2	Ácido Hexadecanóico	-	-	5,89	1,81
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	-	-	0,38	0,25
36.1	Octadecanal	-	-	0,07	0,07
36.9	Ácido Heptadecanóico	-	-	0,12	0,14
37.3	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	-	-	0,03	0,06
37.5	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	0,09	0,10
37.6	Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	0,07	0,07
38.0	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	0,03	0,04
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	0,18	0,28
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	22,63	4,52
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	-	-	15,82	4,10
39.0	Ácido Octadecanóico	-	-	22,07	3,02
39.2	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	0,16	0,09	0,22
39.5	Heneicosanol	-	-	0,03	0,07
39.7	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	-	0,65	-	-
39.8	Metil Éster do Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenóico	-	-	0,04	0,10
39.9	Ácido Eicosanóico	-	-	0,01	0,03
44.8	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	-	-	0,91	1,11
45.2	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	0,5	-	-
46.2	9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	-	0,49	-	-
46.8	Heptacosanol	5	-	-	-
48.8	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	-	0,28	0,03	0,06
49.0	13-Docosenamida	26,89	1,42	0,19	0,23
49.5	Esqualeno	13,34	2,83	0,82	0,66
50.2	Cholesta-2,4-diene	-	0,19	0,06	0,04
50.3	Derivado do Cholesta-2,4-diene	1,09	0,4	0,07	0,06
50.5	Cholesta-4,6-dien-3-ol	3,88	0,75	0,22	0,11
50.8	Cholesta-3,5-diene	3,61	1,38	0,46	0,22
51.9	Ergosta-4,6,22-triene	-	0,37	0,02	0,03
52.3	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	-	0,15	0,09	0,10
52.6	Anthiaergosta-5,7,9,14-tetraene	-	0,33	-	-
53.0	γ -Tocoferol	-	-	0,22	0,19
53.1	3-methoxy-Cholest-5-ene	-	-	0,01	0,02
53.5	Stigmasta-3,5-diene	-	-	0,01	0,01
53.9	Colesterol	22,62	43,46	13,37	4,63
54.0	Colestanol	-	-	0,33	0,26
54.1	α -Tocoferol	-	-	0,19	0,46
54.3	Cholest-7-en-3-one	-	-	0,03	0,07
54.5	Ergosta-5,7-dien-3-ol	5,86	10,66	1,51	0,53
55.3	Cholesta-3,5-dien-7-one	-	3,58	0,07	0,16
55.4	Latosterol	-	-	0,03	0,05
55.5	Ergosterol	-	-	0,15	0,18

55.6	Campesterol	5,39	8,04	1,38	0,48
55.8	Cholest-4-en-3-one	3,81	9,26	0,54	0,75
56.0	Stigmasterol	-	-	0,24	0,20
56.8	Lanost-8-en-3-one	-	0,99	0,37	0,63
56.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	1,56	5,04	0,35	0,27
57.2	Ergosta-4,22-dien-3-one	0,21	2,08	-	-
57.3	Lanost-8-en-3-ol	-	-	7,63	2,35
57.4	Lanosta-8,24-dien-3-one	-	-	0,07	0,18
57.5	γ -Sitosterol	1,53	2,29	0,59	0,22
57.7	Lanosterol	-	1,7	0,61	0,24
58.1	4-Campestene-3-one	-	3	0,08	0,20
58.6	Stigmast-5-en-3-ol???	-	-	0,02	0,05
58.9	Cholest-4-ene-3,6-dione	-	-	0,04	0,09
59.6	γ -Sitostenone	-	-	0,02	0,05

As duas fêmeas adultas estavam em momentos distintos do ciclo reprodutivo, a ♀1 apresentou ovos no oviduto (comprimento dos ovos ~ 11 mm) e na ♀2 foi possível observar folículos em vitelogênese secundária nos ovários. Juntas, as duas fêmeas somaram 32 compostos (**Tabela 3**): dois aldeídos, o heptacosanol, duas cetonas, seis ésteres, a 13-Docosenamida, o esqualeno e 19 esteroides. A ♀1 apresentou 19 compostos lipídicos, sua secreção foi formada, principalmente, por esteroides (TIC = 49,56%), 13-Docosenamida (TIC = 26,89%) e esqualeno (TIC = 13,34%) e sete compostos (dois aldeídos, dois ésteres, duas cetonas e uma amida) não foram identificados na ♀2 e representaram 10,21% da sua secreção. Vinte e cinco compostos foram identificados na ♀2, os esteroides corresponderam à quase totalidade da secreção (TIC = 93,95%) e seus 13 compostos exclusivos (quatro ésteres e nove esteroides) somaram 12,39% da secreção. Dos 32 compostos lipofílicos, 12 foram compartilhados pelas duas fêmeas (**Figura 4**) e suas porcentagens relativas diferiram de forma marcante entre as duas amostras.

O macho coletado em março de 2017 apresentou testículos desenvolvidos e ductos deferentes opacos e enovelados, indicando estar maduro. Nos cinco machos em que a sexagem foi realizada pela eversão do hemipênis (março de 2019), foi possível observar esperma durante o procedimento, revelando que estavam sexualmente ativos no período. Os seis machos somaram 65 compostos lipofílicos (o esqualeno, uma cetona, uma amida, dois álcoois, duas formas do tocoferol, oito aldeídos, 10 ésteres, 11 ácidos graxos e 29 esteroides) (**Tabela 3**) e o número de compostos por indivíduo

variou entre 39 e 44 (**Apêndice**). Apenas vinte e dois compostos (esqualeno, α -Tocoferol, dois ésteres de ácidos graxos, seis ácidos graxos e 12 esteroides) foram identificados em todas as amostras, mas representaram quase a totalidade da secreção de cada indivíduo: 96,95% no ♂1 (CRC = 12,5 cm), 97,72% no ♂2 (CRC = 13 cm), 94,89% no ♂3 (CRC = 13,07 cm), 93,74% no ♂4 (CRC = 13,5 cm), 96,54% no ♂5 (CRC = 16 cm) e 97,97% no ♂6 (CRC = 16 cm). Todos os compostos presentes no ♂2 também foram identificados em outros machos, o ♂3 apresentou 12 compostos exclusivos que representaram 3,68% da sua secreção e os demais machos apresentaram apenas um composto exclusivo (TIC entre 0,02% e 0,54%) (**Apêndice**). Nos machos, a classe de compostos lipofílicos mais abundante foi a dos ácidos graxos (TIC entre 57,19% e 75,44%), seguida pelos esteroides (TIC entre 21,72% e 40,04%) (**Figura 5**). Entre os 11 ácidos graxos identificados, os observados em maiores porcentagens relativas foram o hexadecanóico, o 9,12-Octadecadienóico, o 9-Octadecenóico e o octadecanóico. Entre os esteroides, os dois mais abundantes foram o colesterol e o lanost-8-en-3-ol. O γ -Tocoferol foi identificado em todos os machos, mas com TIC inferior a 0,53% e o α -Tocoferol foi identificado apenas no ♂3. O esqualeno, embora tenha sido identificado em todas as amostras, correspondeu a menos de 2,09% da secreção.

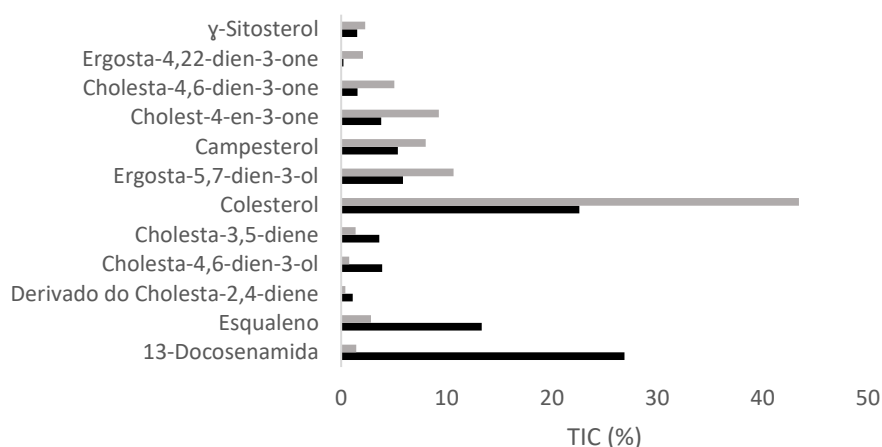


Figura 4. Porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos 12 compostos lipofílicos compartilhados pelas duas fêmeas de *Ameiva ameiva* do domínio morfoclimático da Caatinga. Preto: ♀1. Cinza: ♀2.

Embora não seja possível realizar análises estatísticas para comparações intersexuais, alguns aspectos são bem evidentes. Machos apresentaram elevadas quantidades de ácidos graxos que sequer foram identificados nas duas fêmeas e o

segundo esteroide mais importante na composição da secreção dos machos, o lanost-8-en-3-ol, também não foi identificado no outro sexo. As fêmeas apresentaram maior quantidade de ergosta-5,7-dien-3-ol, campesterol e cholest-4-en-3-one do que os machos.

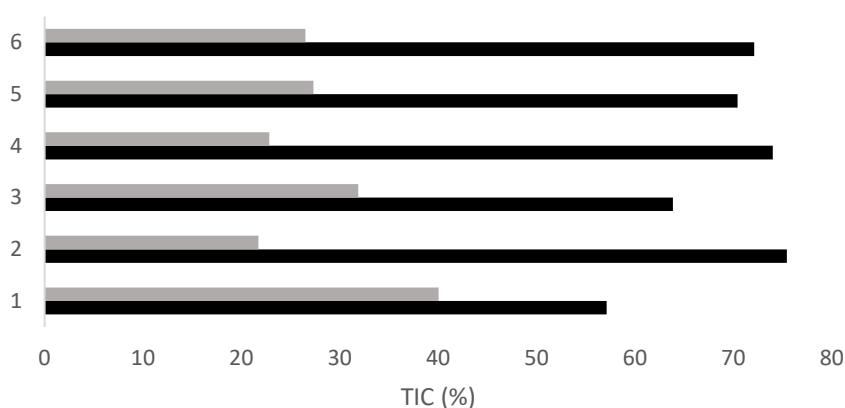


Figura 5. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) das duas principais classes de compostos lipofílicos da secreção femoral de machos adultos de *Ameiva ameiva* do domínio morfoclimático da Caatinga. 1: ♂1 (CRC = 12,5 cm). 2: ♂2 (CRC = 13 cm). 3: ♂3 (CRC = 13,07 cm). 4: ♂4 (CRC = 13,5 cm). 5: ♂5 (CRC = 16 cm). 6: ♂6 (CRC = 16 cm). Preto: ácidos graxos. Cinza: esteroides.

Compostos lipofílicos: Amazônia

Oitenta e nove compostos lipídicos foram identificados em amostras de secreções femorais de oito indivíduos adultos de *A. ameiva* coletados na Amazônia (**Tabela 4**): esqualeno, três formas do tocoferol, três furanonas, três álcoois, três cetonas, cinco amidas, 12 ácidos graxos, 13 aldeídos, 14 ésteres de ácidos graxos e 32 esteroides. Trinta e seis compostos foram compartilhados por machos e fêmeas (esqualeno, 6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone, hexanol, α -Tocoferol, três aldeídos, três ácidos graxos, seis ésteres e 20 esteroides), porém apenas sete compostos foram identificados em todos os indivíduos. Esses sete compostos representaram entre 2,31% e 64,02% da composição da secreção femoral das fêmeas e entre 20,06% e 59,49% da secreção de machos.

Tabela 4. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreção femoral de fêmeas e machos adultos de *Ameiva ameiva* do domínio morfoclimático da Amazônia. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. Os dados são apresentados como a média e o desvio padrão (SD) para cada sexo.

TR	Compostos	♀		♂	
		Média	SD	Média	SD
3.7	2-Hexanona	-	-	0,05	0,10
4.0	Hexanal	0,02	0,03	0,81	1,82
4.2	Hexanol	0,10	0,15	0,05	0,08
8.3	2-Heptenal	-	-	0,09	0,20
12.4	4-Nonenal	-	-	0,06	0,13
15.8	4-Decenal	0,01	0,02	-	-
17.7	2-Undecenal	-	-	0,22	0,50
18.7	2,4-Decadienal	-	-	0,10	0,23
19.3	2,4-Dodecadienal	-	-	0,19	0,42
20.6	2-Dodecenal	-	-	0,10	0,22
24.2	Tridecanal	-	-	0,05	0,09
25.5	Ácido Dodecanóico	-	-	0,02	0,02
26.9	Éster não identificado do Ácido Decanóico	0,01	0,01	0,02	0,04
27.6	2(3H)-Furanone, dihydro-5-(2-octenyl)-	-	-	0,002	0,004
28.1	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-	-	-	0,002	0,004
28.4	Pentadecanol	-	-	0,002	0,004
28.5	Tetradecanona	-	-	0,004	0,009
29.8	Ácido Tridecanóico	-	-	0,14	0,27
30.0	Ácido Tetradecanóico	-	-	0,26	0,47
31.0	Hexadecanal	0,01	0,01	0,01	0,02
32.4	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	0,01	0,01	0,07	0,16
32.5	14-Methyl-8-Hexadecenal	-	-	0,002	0,004
32.6	Heptadecanol	-	-	0,01	0,03
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,03	0,05	0,02	0,03
34.6	Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	0,33	0,49
35.1	9-Octadecenal	-	-	0,45	1,01
35.2	Ácido Hexadecanóico	-	-	6,46	8,24
35.4	Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	1,22	1,09	0,31	0,70
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	3,88	3,85	1,05	2,34
36.1	Octadecanal	0,09	0,14	0,08	0,09
36.9	Ácido Heptadecanóico	-	-	0,64	1,28
37.3	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	-	-	0,03	0,07
37.5	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	0,004	0,009
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	0,02	0,05
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	14,97	14,58	1,33	1,84
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	16,05	13,94	14,31	17,85

38.8	Ácido graxo não identificado de 18C	-	-	0,34	0,76
39.0	Ácido Octadecanóico	10,03	10,41	5,88	5,78
39.1	Hexadecanamida	-	-	0,74	1,04
39.2	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,00	0,01	0,12	0,27
39.3	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,14	0,24	0,10	0,23
39.6	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	0,08	0,13	-	-
40.9	9,12-Octadecadienoic acid-, 2,3-dihydroxypropyl ester	-	-	0,50	0,55
41.0	9-Octadecenamida	-	-	1,17	1,68
41.1	Amida não identificada	-	-	0,29	0,33
41.3	Octadecanamida	-	-	0,23	0,22
41.4	Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenóico	5,59	4,88	-	-
41.5	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	0,87	0,77	-	-
42.2	Furanona não identificada	-	-	0,08	0,17
42.5	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	0,04	0,06
43.2	9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	-	-	0,01	0,02
43.5	Éster não identificado	-	-	0,05	0,07
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,20	0,35	0,09	0,10
47.3	13-Docosenamida	-	-	0,27	0,40
48.0	Esqualeno	1,29	1,82	7,82	5,91
48.2	Cholesta-2,4-diene	0,00	0,01	0,02	0,04
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,29	0,44	0,21	0,36
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	1,13	1,01	0,41	0,42
48.9	Cholesta-3,5-diene	2,28	1,74	0,22	0,17
49.3	Ergosta-5,7,22-trien-3-ol	0,28	0,27	0,02	0,05
49.6	Ergosta-4,6,22-triene	0,40	0,68	0,11	0,20
50.4	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0,74	0,63	0,03	0,03
50.8	β -Tocoferol	-	-	0,02	0,02
51.0	γ -Tocoferol	-	-	0,21	0,17
51.2	3-methoxy-Cholest-5-ene	1,14	0,82	-	-
51.4	Derivado do Cholestan-3-ol	0,18	0,29	-	-
51.8	Colesterol	16,14	16,28	12,43	12,49
52.0	α -Tocoferol	0,09	0,16	1,36	1,89
52.3	Cholest-7-en-3-one	-	-	0,23	0,32
52.4	Desmosterol	-	-	0,01	0,01
52.5	Ergosta-5,7-dien-3-ol	6,30	7,55	1,34	1,26
53.1	Derivado do Ergosta-5,7-dien-3-ol	-	-	0,23	0,52
53.1	Campesterol	4,76	6,99	2,72	1,51
53.5	Cholest-4-en-3-one	4,48	4,55	17,34	12,87
53.8	Lanost-8-en-3-one	-	-	0,66	1,18
53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	1,54	2,20	3,25	3,46
54.1	Cholesta-1,4-dien-3-one	-	-	1,05	1,44
54.2	Ergosta-4,22-dien-3-one	1,54	2,67	1,45	1,54
54.3	Lanost-8-en-3-ol	0,01	0,02	0,05	0,11
54.4	Lanosta-8,24-dien-3-one	-	-	3,48	4,98

54.5	γ -Sitosterol	0,27	0,47	0,20	0,41
54.6	Ergosta-4,6,22-trien-3-one	0,64	1,11	0,48	0,79
54.7	Lanosterol	1,02	0,66	2,09	1,59
55.1	4-Campestene-3-one	1,46	2,52	2,46	2,73
55.6	Stigmast-5-en-3-ol	0,62	1,08	0,90	1,23
55.9	Cholest-4-ene-3,6-dione	-	-	0,95	1,19
56.6	γ -Sitostenone	-	-	0,76	0,86
56.9	Stigmasta-4,24(28)-dien-3-one	-	-	0,03	0,07
57.2	Stigmasta-3,5-dien-7-one	-	-	0,25	0,42

As duas fêmeas da região do Rio Negro apresentaram ovos no oviduto (comprimento dos ovos ~ 20 mm) e a da região do Pico da Neblina apresentou folículos que aparentavam estar no início do processo de vitelogenese secundária. As três fêmeas somaram 42 compostos lipídicos: esqualeno, 6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone, hexanol, α -Tocoferol, quatro aldeídos, cinco ácidos graxos, sete ésteres e 22 esteroides. A ♀1 (Pico da Neblina) apresentou 22 compostos, sendo 20 esteroides (TIC = 99,42%), o esqualeno e o α -Tocoferol. As fêmeas da região do Rio Negro somaram 36 compostos lipofílicos, 33 na ♀2 (CRC = 12,2 cm), 23 na ♀3 (CRC = 14,09 cm) e 20 compostos compartilhados por ambas. A secreção da ♀2 foi composta basicamente de ácidos graxos (TIC = 84,05%) e ésteres (TIC = 10,48%) e a da ♀3 de ácidos graxos (TIC = 58,49%) e esteroides (TIC = 31,77%). A ♀1 compartilhou 14 compostos com a ♀2 e 12 com a ♀3. A maior diferença entre a composição da secreção femoral entre as duas localidades parece ser a porcentagem elevada de ácidos graxos nas amostras da região do Rio Negro e maior porcentagem de esteroides na fêmea da região do Pico da Neblina.

Todos os machos apresentaram testículos desenvolvidos e ductos deferentes opacos e enovelados, indicando que estavam maduros. Os cinco machos somaram 83 compostos lipídicos: esqualeno, três álcoois, três formas do tocoferol, três furanonas, três cetonas, cinco amidas, 10 ácidos graxos, 12 aldeídos, 13 ésteres de ácidos graxos e 30 esteroides. O número de compostos por indivíduo variou entre 29 e 46 (**Apêndice**). Os machos da região do Pico da Neblina somaram 63 compostos e os da região do Rio Negro 50 compostos. A secreção do ♂1 (Pico da Neblina) foi formada por 74,18% de esteroides e 16,38% de esqualeno, do ♂2 (Pico da Neblina) por 27,14% de ácidos graxos e 58,18% de esteroides, do ♂3 (Pico da Neblina) por 66,55% de ácidos graxos e 20,5% de esteroides, do ♂4 (Rio Negro) por 69,89% de esteroides, 11,21% de

esqualeno e 10,71% de ácidos graxos e do ♂5 (Rio Negro) por 43,99% de ácidos graxos e 44,67% de esteroides (**Figura 6**).

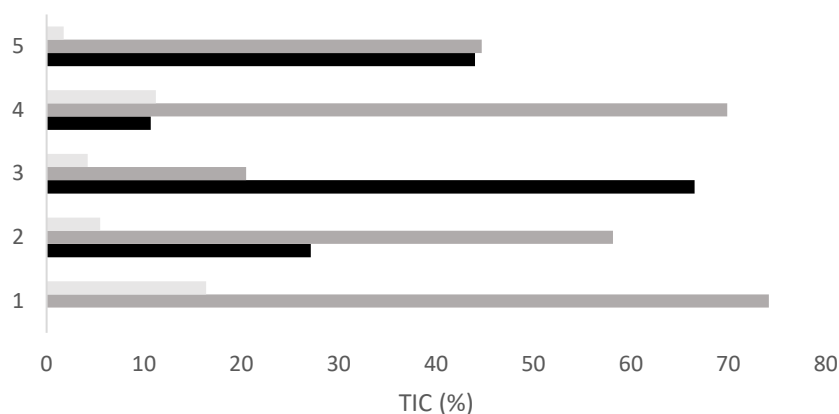


Figura 6. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) das três principais classes de compostos lipofílicos da secreção femoral de machos adultos de *Ameiva ameiva* do domínio morfoclimático da Amazônia. 1: ♂1 (CRC = 14,3 cm). 2: ♂2 (CRC = 15,9 cm). 3: ♂3 (CRC = 16,5 cm). 4: ♂4 (CRC = 11,42 cm). 5: ♂5 (CRC = 15 cm). 6: ♂6 (CRC = 16 cm). Cinza claro: esqualeno. Cinza escuro: esteroides. Preto: ácidos graxos.

Vinte e nove compostos foram detectados em machos das duas localidades, mas apenas sete são compartilhados por todos os indivíduos. Dos 20 compostos exclusivos da região do Rio Negro apenas dois foram identificados nos dois machos (tridecanal e ácido 9,12-Octadecadienóico). Dos 33 compostos exclusivos da região do Pico da Neblina, 11 ocorreram em todos machos e foram, principalmente, amidas e esteroides. Independente da localidade, os machos da Amazônia: (1) apresentaram como ácidos mais abundantes o 9-Octadecenoico, hexadecanoico e octadecanoico, (2) quando não apresentaram significativa porcentagem de ácidos graxos, apresentaram grande quantidade de esqualeno, (3) com exceção de um indivíduo, apresentaram baixas porcentagens de colesterol (TIC < 9%) e o (4) cholest-4-en-3-one foi o esteroide mais abundante. As diferenças entre machos das duas localidades não podem ser testadas, pois há apenas dois machos provenientes da região do Rio Negro. Os dois padrões (mais ácidos graxos ou mais esqualeno) foram observados nas duas localidades.

Embora não tenham sido realizadas análises estatísticas para comparações intersexuais, as duas fêmeas com ácidos graxos em suas secreções, apresentaram grandes quantidades do ácido 9,12-Octadecadienóico (TIC > 15%), ácido pouco abundante nos machos (TIC < 4%) e não apresentaram o ácido hexadecanoico e machos apresentaram maiores quantidades de esqualeno.

Compostos lipofílicos: Comparações

As cinco fêmeas de *A. ameiva* somaram 54 compostos lipofílicos: 13-Docosenamida, α -Tocoferol, esqualeno, dois álcoois, três cetonas, cinco aldeídos, cinco ácidos graxos, 11 ésteres e 25 esteroides. Vinte e um compostos mostraram grande variação, sendo observados em apenas uma das fêmeas. Dos 33 compostos restantes, 21 deles foram compartilhados por fêmeas das duas localidades, independente do seu estado reprodutivo (TIC entre 3,63% e 89,89%). Observando as cinco amostras, nota-se a existência de três padrões de compostos lipídicos. O primeiro padrão é representado pelas duas fêmeas que apresentaram folículos vitelogênicos, uma da Amazônia e uma da Caatinga. Nessas fêmeas foram identificados 31 compostos, sendo 16 deles observados nas duas fêmeas e os esteroides corresponderam à quase totalidade das secreções (Amazônia: TIC = 99,42%; Caatinga: TIC = 93,95%). As duas fêmeas com folículos vitelogênicos compartilharam porcentagens significativas de colesterol, ergosta-5,7 dien-3-ol, campesterol, cholesta-4,6-dien-3-one, cholesta-4-en-3-one, ergosta-4,22-dien-3-one e 4-Campestene-3-one (**Figura 7**).

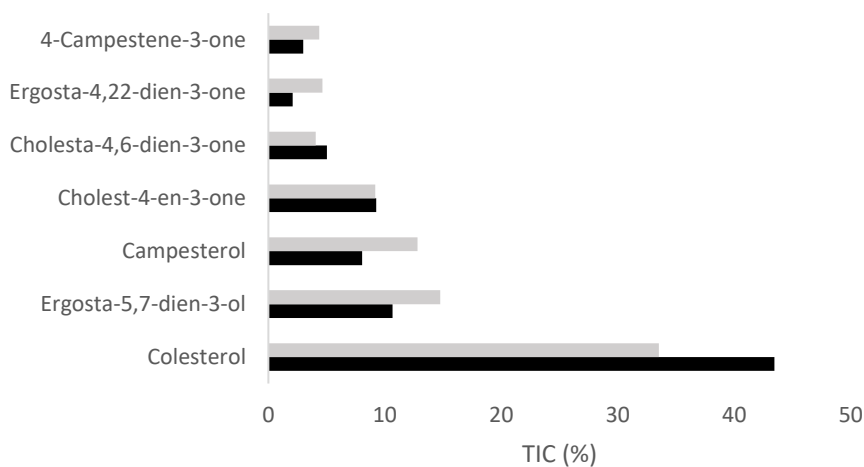


Figura 7. Porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos sete esteroides mais abundantes em fêmeas de *Ameiva ameiva* que apresentaram folículos em vitelogênese secundária. Cinza: Amazônia. Preto: Caatinga.

As três fêmeas com ovos no oviduto podem ser divididas em dois padrões e com apenas 10 compostos compartilhados entre elas. Na fêmea ovada da Caatinga foram identificados 19 compostos, sendo quatro exclusivos, e a secreção foi constituída, principalmente, por esteroides (TIC = 49,56%), 13-Docosenamida (TIC = 26,89%) e esqualeno (TIC = 13,34%). O último padrão foi observado nas duas fêmeas da

Amazônia com ovos oviducais, nas quais foram identificados 35 compostos e os 20 compartilhados pelas duas representaram 99,04% e 99,11% das secreções. Essas fêmeas apresentaram ácidos graxos como a principal classe de compostos lipídicos em suas secreções (TIC = 84,05% e 58,49%) e pequena quantidade de esteroides (**Figura 8**).

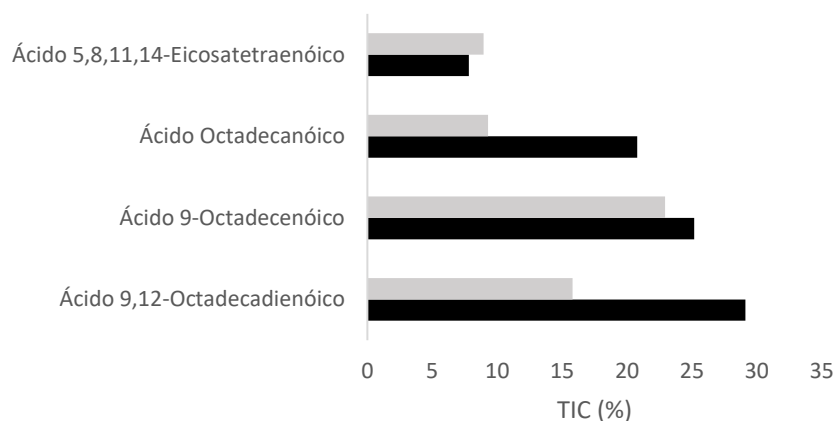


Figura 8. Porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos quatro ácidos graxos mais abundantes em duas fêmeas de *Ameiva ameiva* que apresentaram ovos no oviduto. Cinza: CRC = 14,09 cm. Preto: CRC = 12,2 cm.

Noventa e nove compostos foram identificados em machos de *A. ameiva*, independente da localidade de origem: (1) 33 compostos ocorreram apenas em machos da Amazônia (aproximadamente 40% do total de compostos identificados em machos do domínio), (2) 15 compostos foram identificados apenas em machos da Caatinga (aproximadamente 23% do total de compostos identificados em machos do domínio), (3) 23 compostos foram identificados apenas em um indivíduo e, (4) quando presentes, os ácidos graxos de 18 carbonos são os mais abundantes na secreção femoral. Nenhum composto exclusivo de machos da Caatinga foi observado em porcentagens elevadas (soma do TIC entre 0 e 4,39%) e, embora os compostos exclusivos da Amazônia tenham representado maior parcela das secreções (soma do TIC entre 4,13% e 12,1%), a porcentagem de cada um deles foi inferior a 3,7%. O resultado da PERMANOVA na comparação entre o perfil químico das secreções femorais de machos dos dois domínios morfoclimáticos com base em todos os compostos lipídicos identificados, revelou diferenças significativas entre os machos da Caatinga e da Amazônia (PERMANOVA: *pseudo* $F_{1,10} = 4,02$ e $p = 0,01$). A CAP, com base nas distâncias euclidianas, classificou corretamente 100% dos indivíduos provenientes da Amazônia e aproximadamente 84%

dos machos da Caatinga (apenas um foi classificado erroneamente) (teste permutacional, $\delta_1^2 = 0,79$ e $p = 0,007$).

Todos os machos da Caatinga apresentaram grandes proporções dos ácidos de 18 carbonos e do esteroide lanots-8-en-3-ol, que foi identificado em apenas um macho da Amazônia (TIC = 0,25%) e os machos da Amazônia apresentaram significativas quantidades de esqualeno e do esteroide cholest-4-en-3-one (TIC na Caatinga < 2,1%). Machos da Amazônia nunca apresentaram porcentagens elevadas do ácido 9,12-Octadecadienóico (TIC na Caatinga > 17%). Na Caatinga todos os machos apresentaram secreção formada, principalmente, por ácidos graxos (TIC entre 57,12% e 75,44%) e esteroides (TIC entre 21,72% e 40,04%). Entre os machos da Amazônia, dois tiveram a secreção formada, principalmente, por ácidos graxos (TIC = 66,55% e 43,99%) e esteroides (20,5% e 44,67%), um por ácidos graxos em menor quantidade (TIC = 27,14%) e esteroides (TIC = 58,18%) e dois por esteroides (TIC = 74,16% e 69,89%) e esqualeno (TIC = 16,38% e 11,21%). Machos dos dois domínios apresentaram diferenças significativas em relação a porcentagem de ácidos graxos (Mann-Whitney: $U = 0,01$) e não apresentaram diferenças para as demais classes de compostos lipofílicos (Mann-Whitney: $U > 0,08$).

Vinte compostos, representando entre 57,4% e 89,92% das secreções, foram selecionados para as análises estatísticas por estarem presentes em três ou mais indivíduos de cada domínio. Machos da Caatinga apresentaram, em média, maiores porcentagens do ácido octadecanóico (Mann-Whitney: $U = 0,01$) e menores quantidades de esqualeno (ANOVA: $F_{1,9} = 16,16$ e $p = 0,003$), cholest-4-en-3-one (ANOVA: $F_{1,10} = 18,68$ e $p = 0,002$), cholesta-4,6-dien-3-one (ANOVA: $F_{1,10} = 8,26$ e $p = 0,01$) e lanosterol (ANOVA: $F_{1,9} = 24,02$ e $p = 0,001$) (**Figura 9**).

Cinco componentes principais explicaram 90,16% da variação entre os machos dos dois domínios (**Figura 10**). O PC1 (36,87%) apresentou correlação significativa e positiva com o lanost-8-en-3-one e os machos da Caatinga parecem apresentar porcentagens intermediárias deste esteroide quando comparados com os machos da Amazônia. O PC2 (28,98%) apresentou correlação significativa e positiva com o cholest-4-en-3-one e o cholesta-4,6-dien-3-one, dois compostos que apresentaram diferenças estatísticas entre a Caatinga e a Amazônia. Machos da Caatinga apresentaram menores escores para esses dois esteroides quando comparados com os

machos da Amazônia. A análise discriminante classificou corretamente 100% dos indivíduos de cada um dos dois domínios com base nos escores dos cinco primeiros componentes principais.

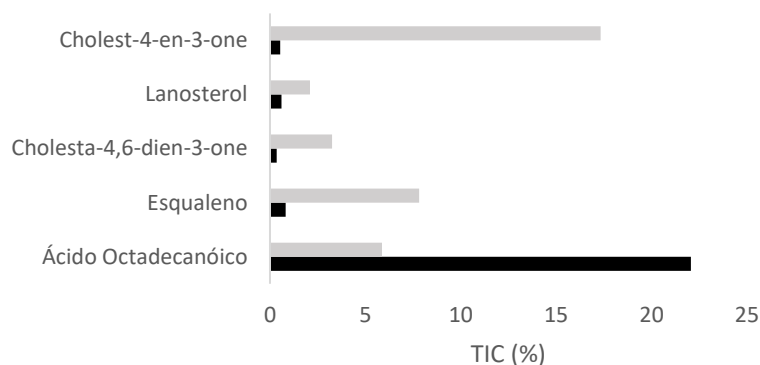


Figura 9. Média por domínio morfoclimático da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos cinco compostos lipofílicos que apresentaram diferenças entre machos de *Ameiva ameiva* da Amazônia e da Caatinga. Cinza: Amazônia. Preto: Caatinga

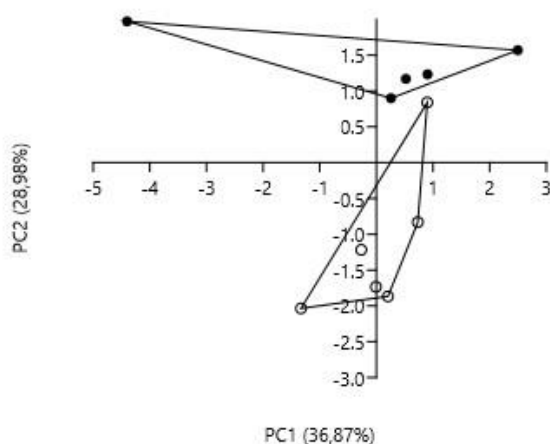


Figura 10. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos de *Ameiva ameiva* da Caatinga (círculos abertos) e Amazônia (círculo fechado) com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 20 compostos lipofílicos.

Para confirmar que as diferenças observadas entre os machos dos dois domínios não se devem à presença de dois machos da Amazônia com pouco ácido graxo na secreção, novas PCA e discriminante foram realizadas excluindo as informações dessas duas amostras. Os dois primeiros PCs dessa explicaram 67,87% da variação entre os dois domínios morfoclimáticos e a discriminante continuou a classificar corretamente 100% dos indivíduos. Alguns outros aspectos merecem atenção: (1) só fêmeas com ovos da região do Rio Negro e machos da Caatinga apresentaram grandes quantidades do ácido 9,12-octadecadienóico, (2) apenas a fêmea com ovos da Caatinga apresentou grandes quantidades de 13-Docosenamida, (3) apenas machos da Caatinga

apresentaram grandes quantidades de lanost-8-en-3-ol, (4) o colesterol foi identificado em todos os indivíduos, porém em quantidades variáveis (TIC entre 1,28% e 34,6%) e (5) o ergosta-5,7-dien-3-ol e o campesterol foram observados em maiores porcentagens apenas nas duas fêmeas com folículos em vitelogênese e na fêmea com ovos da Caatinga.

Padrão proteico

Foi possível determinar o padrão proteico de cinco machos da Amazônia e de duas fêmeas e um macho da Caatinga. As duas amostras do Rio Içá foram analisadas no início do desenvolvimento deste projeto, não há dados de CG-MS para esses indivíduos e ainda não tínhamos disponível o equipamento para realização das imagens dos géis, por esses motivos as duas imagens foram analisadas separadamente no PyElph e essas duas amostras não foram incluídas na análise UPGMA.

Foram identificadas 15 bandas proteicas em *A. ameiva*, variando entre 8 KDa e 59 KDa (**Figura 11**). Com exceção do ♂2 da Amazônia, todos os machos apresentaram padrão com bandas mais intensas do que as observadas nas duas fêmeas da Caatinga, indicando maior quantidade de proteínas nos machos quando comparados com as fêmeas. Três bandas foram identificadas em todos os indivíduos (16 KDa, 17 KDa e 22 KDa) e não foram identificadas bandas proteicas que sejam exclusivas de fêmeas. Machos da região do Rio Içá apresentaram duas bandas exclusivas (27 KDa e 50 KDa). Os três machos da região do Pico da Neblina apresentaram uma banda de 36 KDa que não foi identificada em outras amostras e um macho apresentou uma banda de 15 KDa exclusiva. A banda de 8 KDa foi identificada em dois machos da Amazônia e no macho da Caatinga e, embora não tenha aparecido de forma clara como nas demais amostras, os outros machos apresentaram uma “sombra” nessa posição, indicando que possivelmente possuem tal proteína, porém em menor quantidade.

O fenograma criado a partir da matriz de similaridade mostra maior similaridade entre os três machos com maior número de bandas de proteínas identificadas e maior similaridade do macho com menor número de bandas com as duas fêmeas (**Figura 12**).

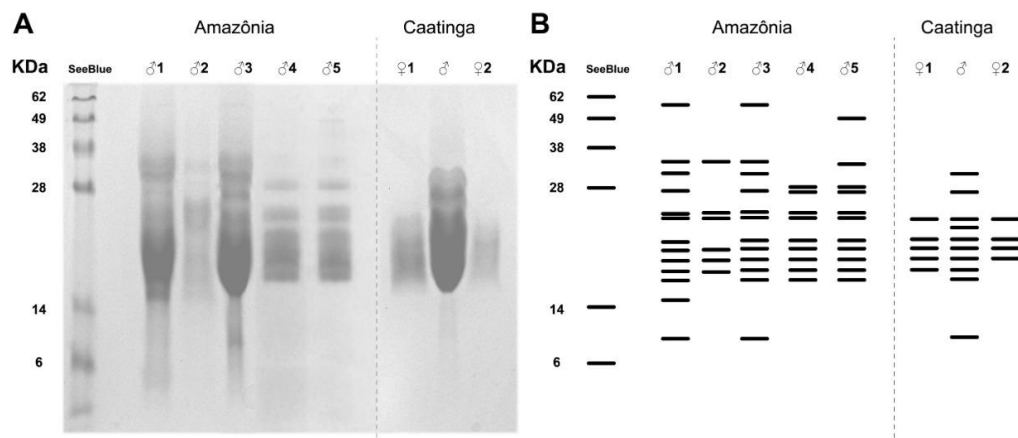


Figura 11. Padrão de bandas proteicas de indivíduos adultos de *Ameiva ameiva* e marcador de peso molecular SeeBlue. **(A)** Imagem original da eletroforese em gel SDS-PAGE em coloração com ComassieBlue e **(B)** mapa indicando as bandas que podem ser observadas no gel. Amazônia: ♂1 – MTR40030, CRC = 15,9 cm, ♂2 – MTR3985, CRC = 14,3 cm, ♂3 – MTR40206, CRC = 14,3 cm, ♂4 – MTR 36230, CRC = 16 cm e ♂5 – MTR36245, CRC = 11,5 cm. Caatinga: ♀1 – MTR39526, CRC = 12,6 cm, ♂ – MTR39578, CRC = 11,5 cm e ♀2 – MTR39643, CRC = 13,6 cm.

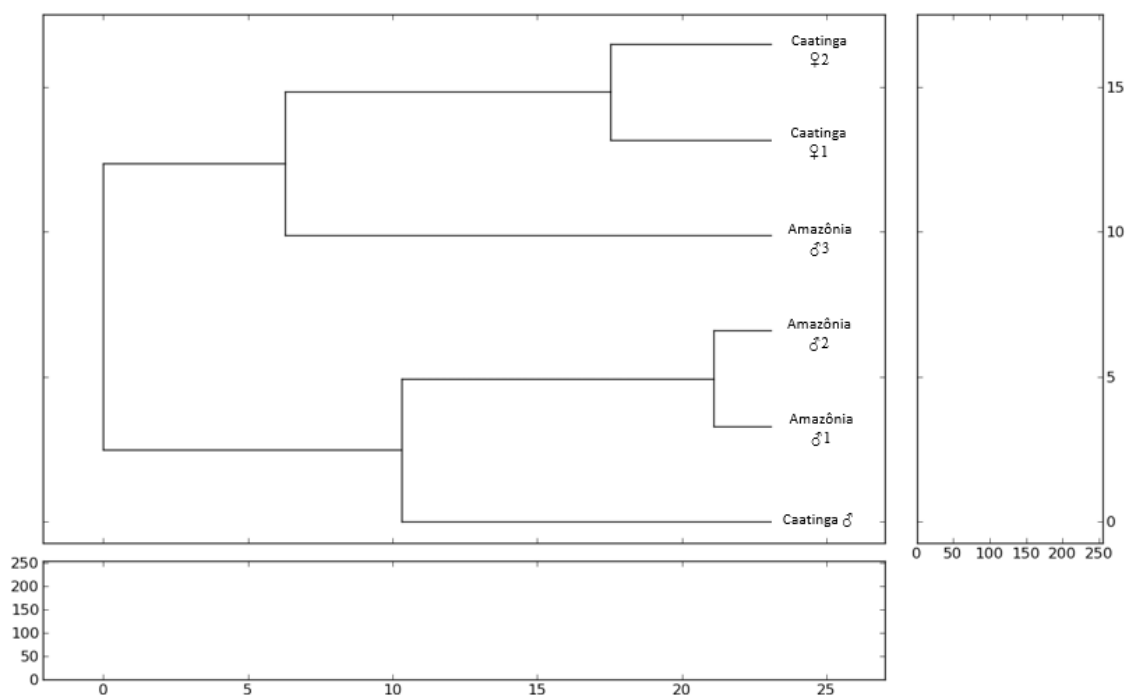


Figura 12. Fenograma gerado pela análise de UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) com base na matriz de similaridade do padrão individual de bandas de proteínas de indivíduos adultos de *Ameiva ameiva* da Caatinga e da Amazônia. Caatinga: ♀1 – MTR39526, ♂ – MTR39578 e ♀2 – MTR39643. Amazônia: ♂1 – MTR40030, ♂2 – MTR3985 e ♂3 – MTR40206.

O macho com menor número de bandas, e maior similaridade com as duas amostras de fêmeas, é um dos machos que não apresentou quantidades significativas de

ácidos graxos em sua secreção. Considerando os três machos com maior diversidade de bandas de proteínas, nota-se que há maior similaridade entre os dois machos provenientes da Amazônia do que entre esses machos e o macho proveniente da Caatinga. Observando as matrizes geradas para as duas eletroforeses, as duas amostras de machos da região do Rio Içá compartilharam maiores similaridades com essas três amostras de machos com maior número de bandas do que com as fêmeas.

Discussão

O número de poros femorais em diferentes espécies de lagartos pode estar relacionado com a história evolutiva, a importância da sinalização química e variáveis ambientais. Em *Ameiva ameiva* os indivíduos da Caatinga apresentaram maior número de poros femorais do que os indivíduos da Amazônia. Sabemos que, ao menos em cativeiro, a espécie não apresenta dimorfismo sexual no número e no diâmetro dos poros femorais (IMPARATO *et al.*, 2007). Ao contrário do observado entre espécies de Lacertidae (BAECKENS *et al.*, 2015), a variação no número de poros femorais entre as populações de *A. ameiva* dos dois domínios não pode ser explicada por diferenças no uso de substrato, uma vez que a espécie é estritamente terrestre e ocupa áreas abertas em ambos domínios (VITT & COLLI, 1994) e nem por diferenças em territorialidade, pois os machos da espécie são bastante agressivos e entram em confronto para defender fêmeas e território (COSTA *et al.*, 2010). Os dados climáticos obtidos indicam que os dois domínios morfoclimáticos apresentam temperaturas elevadas, porém há diferenças significativas nas variáveis relacionadas à umidade, com a Amazônia apresentando maior precipitação. Embora essa relação entre as variáveis ambientais e o número de poros não tenha sido observada entre espécies de Lacertidae (BAECKENS *et al.*, 2015) e de *Liolaemus* (PINCHEIRA-DONOSO *et al.*, 2008), não podemos excluir essa possibilidade para *A. ameiva*, uma vez que as condições de umidade da Caatinga e da Amazônia são extremamente distintas e o clima seco da Caatinga pode acelerar a volatilização das marcações químicas no substrato. Também não podemos excluir a possibilidade de que a seleção sexual tenha intensidades distintas em diferentes populações, com fêmeas da Caatinga preferindo copular com machos com maior produção de secreção e maior número de poros femorais. Um estudo mais amplo,

incluindo mais espécies de Teiidae permitirá uma melhor compreensão da evolução do número de poros femorais na família.

Em Squamata, os folículos vitelogênicos são ovulados e então fecundados nos ovidutos; em *A. ameiva* a ovulação ocorre com aproximadamente 10 mm de comprimento (VITT, 1982) e ovos com aproximadamente 14 mm de comprimento já estão fecundados (COSTA *et al.*, 2010). As duas fêmeas de *A. ameiva* com folículos em vitelogênese, apresentaram folículos pequenos (< 5 mm de comprimento) e entre as fêmeas com ovos no ovidutos, duas apresentaram ovos com aproximadamente 20 mm de comprimento, indicando que estavam fecundados e prontos para serem postos e uma apresentou ovos com aproximadamente 11 mm de comprimento, sugerindo que estivesse pronta para copular. Embora não tenha sido possível realizar análises estatísticas, os resultados deste trabalho revelaram que as fêmeas de *A. ameiva* apresentam padrão complexo de compostos lipídicos, com variação individual e variações que parecem estar associadas com diferenças no estado reprodutivo. A secreção das duas fêmeas com folículos vitelogênicos foi composta basicamente por esteroides (TIC > 93%), principalmente o colesterol, o campesterol, o ergosta-5,7-dien-3-ol e o cholest-4-en-3-one. A fêmea que apresentou ovos pequenos apresentou grandes quantidades de esteroides, esqualeno e 13-Docosenamida (erucamida) e quantidades intermediárias de ergosta-5,7-dien-3-ol e colesterol. As fêmeas com ovos grandes apresentaram secreção formada principalmente por ácidos graxos (TIC > 58%) e baixas quantidades de colesterol e ergosta-5,7-dien-3-ol. Levando em consideração a abundância de alguns compostos nas secreções das fêmeas de *A. ameiva*, suas respectivas funções em outros organismos e a variação no estado reprodutivo das fêmeas, podemos elaborar algumas suposições iniciais que podem guiar a continuidade do estudo das interações químicas em fêmeas de *A. ameiva*.

As duas fêmeas com folículos em vitelogênese e a fêmea com ovos pequenos apresentaram compostos que conferem maior estabilidade para as secreções e baixíssima quantidade de compostos odoríferos (como, por exemplo, ácidos graxos e aldeídos) (BAECKENS *et al.*, 2017) ao contrário do que foi observado nas duas fêmeas com ovos maiores e em machos. Um padrão similar foi observado em *Gallotia simonyi* (Lacertidae), nos quais machos apresentaram maiores quantidades de compostos odoríferos e fêmeas apresentaram secreções mais estáveis, sugerindo diferentes funções

da secreção femoral em machos e fêmeas na espécie (MARTÍN *et al.*, 2015b). Fêmeas em diferentes momentos do seu ciclo reprodutivo apresentam necessidades e comportamentos distintos, fêmeas com folículos em vitelogênese ou ovos não fecundados precisam se locomover ativamente para forragear e encontrar parceiros para cópula e podem se beneficiar de secreção que possibilite que as marcações permaneçam mais tempo no substrato e possam ser identificadas por coespecíficos. Fêmeas grávidas de *A. ameiva* podem permanecer escondidas em tocas ou reduzir sua locomoção (COLLI, 1991) e se machos são capazes de localizar fêmeas apenas com base em informações químicas presentes no meio, como sugerido por COSTA e colaboradores (2010), fêmeas já fecundadas podem se beneficiar de aumentar a volatilidade de sua secreção, permitindo que machos percebam seu estado reprodutivo antes de se aproximarem para tentar cópula, evitando assim injúrias físicas comuns em cópulas forçadas em lagartos (CENSKY, 1997; LE GALLIARD *et al.*, 2005). É interessante ressaltar que as fêmeas com ovos fecundados, que, em tese, não precisariam mais copular, apresentaram grandes quantidades dos ácidos 9,12-Octadecadienóico, 9-Octadecenóico e octadecanóico, ácidos graxos frequentemente encontrados na secreção femoral de lagartos (MARTÍN *et al.*, 2011) e que também foram abundantes nos machos de *A. ameiva*, tornando a secreção dessas fêmeas mais parecida com as dos machos da espécie.

O ergosta-5,7-dien-3-ol foi identificado apenas em pequenas quantidades em *Psammmodromus algirus* (MARTÍN *et al.*, 2016a), porém o ergosta-5,8-dien-3-ol, um esteroide muito similar ao ergosta-5,7-dien-3-ol, foi identificado em diferentes espécies (LÓPEZ *et al.*, 2005; MARTÍN & LÓPEZ, 2006b; GABIROT *et al.*, 2010) e, assim como o campesterol, seu aumento nas secreções está relacionado com o aumento do risco de predação e níveis de estresse em *Iberolacerta cyreni* (ARAGÓN *et al.*, 2008). As quantidades de ergosta-5,7-dien-3-ol em fêmeas de *A. ameiva* parecem estar associadas com o estado reprodutivo, sendo as fêmeas com ovos grandes, que permanecem escondidas e/ou se locomovem menos, as que apresentaram menores quantidades deste esteroide. Levando em consideração que fêmeas que se locomovem mais pelo território estão sujeitas a maiores níveis de estresse (presença de predadores, encontros com machos adultos que podem tentar cópula forçada etc.) e a semelhança química entre o ergosta-5,8-dien-3-ol e o ergosta-5,7-dien-3-ol, seria interessante amostrar mais fêmeas em diferentes momentos do ciclo reprodutivo e avaliar a função deste esteroide nas

secreções. O cholest-4-en-3-one foi observado em pequenas quantidades na secreção de fêmeas reprodutivas de *Liolaemus wiegmannii* (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b) e em maiores quantidades em fêmeas de *Gallotia simonyi* (MARTÍN *et al.*, 2015b). Não há na literatura informações sobre a função do cholest-4-en-3-one em lagartos, mas sabe-se que este é um metabólito intestinal do colesterol e que em ratos está associado com a inibição do ganho de peso e acúmulo de corpos adiposos (SUZUKI *et al.*, 1998). As fêmeas que apresentaram maior quantidade do cholest-4-en-3-one foram justamente as fêmeas que estavam na fase de vitelogênese e que necessitam acelerar a redução dos corpos adiposos para direcionar energia para a atividade reprodutiva (SMITH, 1968).

A erucamida foi identificada em poucas espécies de lagartos e sempre em quantidades baixas (TIC < 2%) (MARTÍN *et al.*, 2013; GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a) e não há função descrita para répteis, mas é uma amida que desempenha importantes funções metabólicas em vertebrados como, por exemplo, o controle de balanço de água no corpo (TALMIMANI *et al.*, 2018). Este composto foi identificado apenas nas fêmeas da Caatinga e em grande quantidade apenas na fêmea com ovos pequenos, embora não seja possível elaborar uma hipótese consistente da potencial função da erucamida nas secreções femorais de fêmeas de *A. ameiva*, este é um composto que parece desempenhar importantes funções metabólicas, sendo pouco provável que sua presença na secreção seja aleatória. O campesterol é um esteroide de origem vegetal bastante comum (WELDON *et al.*, 2008) e em lagartos já foi associado com diferentes aspectos. Em *Podarcis muralis* (HEATHCOTE *et al.*, 2014) o aumento da quantidade de campesterol nas secreções está associado com melhores qualidades de termorregulação. Em *P. algirus*, machos mais velhos/maiores apresentaram maiores quantidades de campesterol e esta diferença pode estar associada com variações na dieta (MARTÍN & LÓPEZ, 2006b). Podemos excluir a hipótese de que o campesterol sinalize idade/tamanho em fêmeas de *A. ameiva* porque não há correlação entre o CRC e a quantidade de campesterol, mas não podemos excluir que esteja relacionado com variações na dieta ou na qualidade da termorregulação. O esqualeno foi identificado em todas as fêmeas (TIC > 0,3%), mas apenas a fêmea com ovos pequenos apresentou quantidades significativas deste composto lipofílico (TIC = 13,34%).

Embora apresente variação interindividual, ácidos graxos e esteroides foram as classes de compostos responsáveis pela maior porcentagem da secreção de machos de

A. ameiva. Comparando a composição lipídica da secreção de machos de *A. ameiva* com a de machos de *Salvator merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), encontramos 29 compostos compartilhados pelas duas espécies e o mesmo padrão atípico para lagartos com grandes porcentagens de ácidos graxos de 16 e 18 carbonos. A explicação proposta por MARTÍN e colaboradores (2011) para as elevadas porcentagens de ácidos em *S. merianae* é a quantidade também atípica desses compostos na gordura e na musculatura da espécie (FERREIRA *et al.*, 2009; VEGA PARRY *et al.*, 2013). Até onde pudemos conferir, não há na literatura informação sobre a composição química dos corpos adiposos ou musculatura de *A. ameiva*, ou de outra espécie do mesmo gênero, porém há dados que indicam que os lipídios presentes em diferentes tecidos de lagartos podem apresentar variação significativa relacionada à dieta ou serem bastante conservativos demonstrando sua importância em determinados processos metabólicos (SIMANDLE *et al.*, 2001). Se a elevada quantidade de ácidos graxos em corpos adiposos de *S. merianae* for uma característica mais ampla que se aplique as demais espécies de Teiidae, a grande porcentagem de ácidos graxos em *A. ameiva* pode ter uma explicação semelhante.

Um aspecto adicional em relação a porcentagem de ácidos graxos nas secreções femorais é que machos de *S. merianae* apresentaram pouca variação na quantidade desses ácidos (MARTÍN *et al.*, 2011), porém entre os machos de *A. ameiva* da Amazônia há grande variação. Todos os machos de *S. merianae* utilizados no trabalho de MARTÍN e colaboradores (2011) eram machos adultos e em começo de estação reprodutiva em um cativeiro na Argentina, por outro lado, em *A. ameiva* sabemos que a reprodução é prolongada, potencialmente contínua, desde que tenham condições ambientais favoráveis (VITT, 1982; COLLI, 1991; VITT & COLLI, 1994). É possível que em uma mesma semana e em uma mesma localidade, se colem machos adultos de *A. ameiva* que estejam em diferentes momentos de seu ciclo reprodutivo, o que pode gerar alterações significativas na composição química das secreções femorais. Este conjunto de dados nos leva à hipótese de que em espécies de Teiidae os ácidos graxos, que são compostos odoríferos que aumentam significativamente a volatilidade das secreções femorais em lagartos (BAECKENS *et al.*, 2017) e podem apresentar elevado custo metabólico para o indivíduo, como é o caso do ácido 9,12-Octadecadienóico (MARTÍN *et al.*, 2011), podem estar relacionados apenas com machos que estejam sexualmente ativos.

O colesterol tem sido um esteroide encontrado em abundância em secreções de lagartos da família Lacertidae e sua principal função reconhecida é a de atuar como uma matriz não reativa que confere maior estabilidade para os demais compostos que atuam como verdadeiros semioquímicos (WELDON *et al.*, 2008). Características específicas da histologia e morfologia das glândulas femorais de *S. merianae* (CHAMUT *et al.*, 2009), somadas a função reconhecida do colesterol, levaram à hipótese de que em *S. merianae* a estabilidade das secreções se daria pela presença de queratina e camadas epiteliais presentes ao redor dos plugues, explicando a ausência do composto na espécie (MARTÍN *et al.*, 2011). O estudo das glândulas e plugues femorais de *A. ameiva* revelou que, assim como *S. merianae*, a espécie também apresenta uma camada epitelial ao redor do plugue, sugerindo que essa camada conferiria estabilidade para a secreção liberada (IMPARATO *et al.*, 2007). Se assim como em *S. merianae*, a estabilidade da secreção de *A. ameiva* é garantida pela presença de queratina e camadas epiteliais, é provável que o colesterol tenha outra função na espécie e a ausência deste esteroide em *S. merianae* precisa ser mais bem estudada. Outras funções para o colesterol vêm sendo descobertas com estudos comportamentais baseados nas secreções femorais de lagartos. Em *Acanthodactylus boskianus* (Lacertidae) o aumento de colesterol parece sinalizar força entre machos e elicitava agressividade (KHANNOON *et al.*, 2011b) e em *A. arythrurus* machos mais velhos tendem a ter menor quantidade de colesterol em suas secreções (LÓPEZ & MARTÍN, 2005a). Em *I. monticola*, embora o colesterol também pareça estar relacionado com a capacidade de luta e comunicação entre machos (MARTÍN & LÓPEZ, 2007), fêmeas não parecem escolher machos com base na quantidade deste esteroide (MARTÍN & LÓPEZ, 2006c). Os resultados de *A. ameiva* indicam que há uma tendência de machos maiores apresentarem menor quantidade de colesterol, porém essa relação não é significativa, sendo assim, uma maior amostragem de machos de *A. ameiva* com diferentes CRC poderia confirmar se este esteroide sinaliza idade/tamanho na espécie.

Os resultados mostraram que a composição da secreção de machos de *A. ameiva* apresenta diferenças significativas entre as amostras provenientes da Caatinga e da Amazônia e que essa é uma boa fonte de dados para identificar a origem dos indivíduos. As diferenças encontradas entre populações que apresentam certo grau de divergência molecular, assim como diferenças encontradas entre espécies próximas (GABIROT *et al.*, 2010; GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a), têm auxiliado na identificação de complexos

crípticos de espécies (ZOZAYA *et al.*, 2019), na compreensão de processos de isolamento reprodutivo (GABIROT *et al.*, 2012 e 2013) e podem ser explicadas por alterações genéticas entre essas populações, sem a necessidade de evocar questões adaptativas (GABIROT *et al.*, 2008; MARTÍN *et al.*, 2015a). Por outro lado, variações na composição das secreções também têm sido identificadas entre populações sem grandes diferenças genéticas, revelando a interferência das condições ambientais (MARTÍN *et al.*, 2015a), assim como entre indivíduos de uma mesma espécie com condições distintas de dieta (GARCÍA-ROA *et al.*, 2017) e qualidade de termorregulação (HEATHCOTE *et al.*, 2014). *Ameiva ameiva* tem sido considerada uma única espécie de ampla distribuição, que ocupa áreas abertas em diferentes domínios morfoclimáticos da América do Sul, porém dados morfológicos indicam que as populações na porção mais ao norte da Amazônia podem representar um maior número de espécies, revelando especiação críptica em *A. ameiva* (UGUETO & HARVEY, 2011). Trabalhos filogenéticos baseados em dados moleculares apresentam baixa amostragem de material de *A. ameiva* impedindo uma melhor compreensão da variabilidade genética apresentada entre as populações da espécie (REEDER *et al.*, 2002; GIUGLIANO *et al.*, 2007 e 2013; GOICOECHEA *et al.*, 2016). As amostras de *A. ameiva* da Amazônia obtidas para este trabalho foram coletadas em localidades que potencialmente podem fazer parte deste complexo críptico sugerido por UGUETO e HARVEY (2011), porém não há dados moleculares disponíveis para afirmar o grau de divergência genética entre os machos da Caatinga e da Amazônia. Baseado neste contexto teórico, a discussão a seguir, acerca das diferenças químicas encontradas entre machos dos dois domínios morfoclimáticos, foi realizada com base em potenciais interferências das condições ambientais na eficiência e durabilidade dos sinais químicos, porém não podemos ignorar que parte dessas diferenças observadas podem ser consequência da variabilidade genética ainda não testada, não representando adaptações a diferentes condições climáticas.

A durabilidade de uma informação química no meio é um importante aspecto da comunicação química (BAECKENS *et al.*, 2015) e a eficiência dos sinais químicos depende de condições ambientais (BOSSERT & WILSON, 1963; LINKLATER *et al.*, 2013). O aumento da temperatura, aumenta a volatilidade dos compostos químicos presentes nas secreções, reduzindo sua duração no meio, que é particularmente importante nas marcações químicas presentes no substrato (ALBERTS, 1992). Em um

experimento com *I. cyreni* foi demonstrado que o aumento artificial da temperatura do meio interfere na detectabilidade e na duração das informações químicas e que este efeito é mais intenso em populações que naturalmente habitam localidades com temperaturas mais amenas (MARTÍN & LÓPEZ, 2013). Em ambientes com maiores índices de umidade os compostos químicos presentes nas secreções podem ser rapidamente oxidados ou mesmo removidos do substrato (ALBERTS, 1992; BAECKENS *et al.*, 2017). Entre espécies de Lacertidae foi encontrada uma relação significativa entre as condições climáticas e a composição das secreções, espécies de clima mais xérico apresentam maior porcentagem de compostos de elevado peso molecular (álcoois de cadeia longa e ésteres de ácidos graxos), com menor volatilidade, e espécies de clima méxico apresentam maior porcentagem de compostos odoríferos mais voláteis (aldeídos e álcoois de cadeia curta) (BAECKENS *et al.*, 2017). Essas diferenças em Lacertidae podem ainda ser testadas com observações comportamentais, buscando por evidências que demonstrem que as espécies de clima mais xérico, com compostos menos voláteis, direcionam mais dardejadas ao substrato, enquanto as espécies de clima mais méxico, com compostos mais voláteis, direcionam mais dardejadas ao ar, se beneficiando de uma comunicação de maior alcance (BAECKENS *et al.*, 2017).

Em relação à temperatura, a Caatinga e a Amazônia apresentam desafios similares para uma comunicação química eficiente, porém em relação à umidade, enquanto a Caatinga é extremamente seca na maior parte do tempo, a Amazônia apresenta elevada umidade. Machos de *A. ameiva*, que estão sujeitos a ambientes com elevada umidade, apresentaram maiores quantidades de esqualeno, cholest-4-en-3-one e cholesta-4,6-dien-3-one. O cholest-4-en-3-one e cholesta-4,6-dien-3-one são dois esteroides produtos da oxidação do colesterol e que, além de poderem estar relacionados com a quantidade de gordura no organismo (SUZUKI *et al.*, 1998), são potencialmente mais estáveis em condições de elevada umidade e intensa oxidação quando comparados com outros esteroides. O esqualeno é um antioxidante que pode atuar na proteção dos demais semioquímicos presentes nas secreções em espécies de ambientes úmidos (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a). A presença de maior quantidade de compostos antioxidantes em lagartos de ambientes úmidos tem sido encontrada mesmo quando comparadas espécies diferentes (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a) e o esqualeno foi identificado em todos os machos de *A. ameiva*, revelando assim que a diferença em sua porcentagem na secreção

de indivíduos da Caatinga e da Amazônia está relacionada com as variáveis ambientais de umidade e não com uma potencial variabilidade genética entre as populações.

Um aspecto que inicialmente nos parece contra intuitivo é a grande quantidade de ácidos graxos presentes na secreção de *A. ameiva*, sendo ainda maior nos machos provenientes da Caatinga. Ácidos graxos são compostos odoríferos que volatizam com certa facilidade, principalmente em ambientes com elevada temperatura e baixa umidade (ALBERTS, 1992). Duas possibilidades, não mutuamente exclusivas, podem explicar esse padrão. Como discutido anteriormente, os indivíduos de *A. ameiva* da Caatinga apresentam maior número de poros femorais. A maior produção de secreção, aumenta o número de cópias daquela informação, permitindo que o sinal permaneça mais tempo no meio, mesmo sob condições climáticas desfavoráveis (ESCOBAR *et al.*, 2001). A outra explicação possível está relacionada com aspectos ecológicos e de comportamento social das espécies. Em *Uromastix aegyptia* (Agamidae), uma espécie de clima árido, foram encontradas quantidades inesperadas de ácidos graxos entre 14 e 18 carbonos e aspectos comportamentais parecem explicar esse padrão, uma vez que a espécie passa longos períodos dentro de túneis que apresentam condições climáticas distintas (MARTÍN *et al.*, 2016b). *Ameiva ameiva* é uma espécie que também passa parte do tempo em tocas, saindo para termorregular, forragear e buscar por parceiros, retornando para dentro de suas tocas se o dia permanecer nublado por longos períodos (VITT & COLLI, 1994). A comunicação química em *A. ameiva* pode tanto se beneficiar da elevada quantidade de ácidos graxos dentro das tocas onde as condições climáticas são mais favoráveis a estes compostos, como sua quantidade pode permitir maior durabilidade das informações mesmo que em condições de elevada volatilidade.

Os machos de *A. ameiva* da Caatinga apresentaram maiores quantidades dos ácidos octadecanóico (esteárico) e 9,12-Octadecadienóico (linoleico) e do lanost-8-en-3-ol, sendo que os últimos dois foram encontrados, respectivamente, em dois e um machos da Amazônia e em quantidades muito inferiores. O lanost-8-en-3-ol já foi identificado em diferentes espécies de lagartos (MARTÍN & LÓPEZ, 2006b; ARAGÓN *et al.*, 2008; WELDON *et al.*, 2008; MARTÍN *et al.*, 2016b) e apresentou significativa variação individual em *Cordylus giganteus* (Cordylidae) (LOUW *et al.*, 2007), mas sua função em secreções femorais de lagartos permanece desconhecida. Na literatura o ácido linoleico aparece em grandes quantidades apenas na secreção de machos de *S.*

merianae (MARTÍN *et al.*, 2011). Ácidos insaturados, como o linoleico, são encontrados em maior quantidade durante a estação reprodutiva de certos Iguanidae, aumentando a volatilidade e, potencialmente, a detectabilidade das informações químicas (ALBERTS, 1992). Embora sua função em secreções de lagartos ainda não tenha sido testada, MARTÍN e colaboradores (2011) acreditam que esta função deve ser de extrema importância em *S. merianae*, pois o ácido linoleico tem origem na dieta e está envolvido em diferentes processos metabólicos fundamentais para a manutenção da saúde. Diferenças nos itens alimentares disponíveis na Caatinga e na Amazônia podem ser uma explicação para a diferença na porcentagem do ácido linoleico e para os machos da Caatinga, assim como para *S. merianae*, é provável que este ácido desempenhe um importante papel nas interações químicas. O ácido esteárico está relacionado com o *status* de saúde em duas espécies de Lacertidae, com indivíduos com menos parasitas e melhor resposta imune apresentando menores quantidades deste ácido (MARTÍN *et al.*, 2007 e 2008). Em *A. boskianus* machos apresentam maior quantidade do ácido esteárico e, por ser um ácido graxo saturado, apresenta menor volatilidade aumentando a duração das marcações químicas (KHANNON *et al.*, 2011b). Pela elevada quantidade do ácido linoleico em machos de *A. ameiva* da Caatinga, seu elevado custo para o metabolismo e sua relação com significativas quantidades do ácido esteárico, é pouco provável que em *A. ameiva* o ácido esteárico esteja associado com piores condições de saúde, porém experimentos comportamentais precisam ser realizados para que se possa compreender a função de cada um desses ácidos nas secreções femorais da espécie.

Ameiva ameiva apresentou padrão complexo de bandas de proteínas com tamanhos entre 8 KDa e 15 KDa e com variações individuais e sexuais em relação, não apenas à presença/ausência de determinadas bandas, como também em relação à intensidade das bandas proteicas identificadas. Embora as proteínas representem a maior porção das glândulas femorais de lagartos, pouco se sabe acerca da sua composição e, menos ainda, sobre o seu papel funcional em interações sociais (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Assim como em *Iguana iguana* (Iguanidae) (ALBERTS *et al.*, 1993), em *A. ameiva* não foram observados dois indivíduos com padrão idêntico de proteínas e há diferenças populacionais e sexuais, indicando tanto a base genética da composição de proteínas na secreção, como seu potencial papel em interações sociais. Em *A. ameiva*, o macho que apresentou maior similaridade proteica com as fêmeas, foi

justamente o que não apresentou ácidos graxos em sua secreção. Esse pode ser mais um indício do *status* reprodutivo daquele indivíduo e esse tipo de informação é potencialmente relevante para as fêmeas. Variações interpopulacionais em componentes proteicos também foram identificados em *P. muralis* e podem ser explicados tanto por variáveis genéticas quanto por variáveis ambientais (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Mais amostras são necessárias para confirmar a constância das variações e se a identificação das proteínas exclusivas das amostras provenientes da Amazônia auxiliaria na compreensão da causa dessas diferenças.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os machos de *A. ameiva* apresentam diferenças significativas na composição química de sua secreção femoral quando comparamos indivíduos de dois domínios morfoclimáticos com características tão discrepantes de umidade. Nossas duas hipóteses iniciais foram corroboradas pelos resultados, com machos da Amazônia apresentando compostos mais resistentes à oxidação e machos da Caatinga com maior produção de secreção. Os dados obtidos para as fêmeas são mais exploratórios, mas assim como em alguns machos da Amazônia, podem ser observadas variações que parecem estar associadas com diferentes condições reprodutivas dos indivíduos. Se pretendemos compreender a importância dos sinais químicos em diferentes espécies de lagartos, assim como utilizar essa fonte de informações em estudos filogenéticos, precisamos ampliar nosso conhecimento acerca da história natural das espécies neotropicais e a influência da reprodução na composição química.

Conclusões

- Indivíduos da Caatinga apresentam maior número de poros femorais. Essa diferença não pode ser explicada por diferenças no uso de substrato ou territorialidade, porém podem estar relacionadas com diferenças climáticas ou por preferências das fêmeas.
- Nas fêmeas foram identificados 54 compostos e as diferenças observadas parecem ter mais associação com o estado reprodutivo do que com diferenças nas condições climáticas. Fêmeas com folículos vitelogênicos apresentaram secreções mais estáveis e fêmeas com ovos grandes apresentaram maior quantidade de compostos odoríferos.

- Machos de *Ameiva ameiva*, assim como de *Salvator merianae*, apresentaram grande quantidade de ácidos graxos, indicando que esta pode ser uma característica compartilhada por Teiidae e parece estar associada com o estado reprodutivo. Ao contrário de *S. merianae*, *A. ameiva* apresentou colesterol em sua secreção, indicando que este composto deve apresentar outra função que não a de atuar como matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos.

- Há diferenças significativas entre a composição lipofílica da secreção de machos provenientes da Caatinga e da Amazônia. Embora não seja possível descartar que parte dessas diferenças sejam consequência de uma divergência genética ainda não estudada, alguns aspectos parecem estar fortemente relacionados com as diferenças de umidade entre os dois domínios morfoclimáticos. Machos da Amazônia apresentaram grande quantidade de esqualeno (antioxidante) e de dois esteroides (cholest-4-en-3-one e cholesta-4,6-dien-3-one) que conferem maior durabilidade das secreções em ambientes úmidos.

- A grande quantidade de ácidos graxos pode ser explicada pelo aumento da produção de secreção nos machos da Caatinga e/ou por aspectos comportamentais da espécie que precisam ser verificados (direção das dardejadas, tempo gasto dentro das tocas etc.).

- *Ameiva ameiva* apresentou padrão complexo de bandas de proteínas, não há dois indivíduos compartilhando exatamente o mesmo padrão e há diferenças que parecem estar relacionadas tanto com a origem do indivíduo, quanto com o *status* reprodutivo, com machos com grande quantidade de ácidos graxos apresentando maior número de bandas proteicas e com maior intensidade.

Apêndice

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todos os machos de *Ameiva ameiva*. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Amazônia: ♂1 – MTR39805, CRC = 14,3 cm; ♂2 – MTR40030, CRC = 15,9 cm; ♂3 – MTR40206, CRC = 16,5 cm; ♂4 – MTR40725, CRC = 11,42 cm e ♂5 – MTR41347, CRC = 15 cm. Caatinga: ♂6 – CRC = 12,5 cm; ♂7 – CRC = 13 cm; ♂8 – MTR39578, CRC = 13,1 cm; ♂9 – CRC = 13,5 cm; ♂10 – CRC = 16 cm e ♂11 – CRC = 16 cm.

Compostos	AMAZÔNIA					CAATINGA					
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♂6	♂7	♂8	♂9	♂10	♂11
2-Hexanona	-	-	-	-	0,23	-	-	-	-	-	-
Hexanal	-	-	-	-	4,07	0,02	0,02	-	0,01	0,02	-
Hexanol	-	-	-	0,19	0,08	0,05	0,03	-	0,01	-	0,02
2-Heptenal	-	-	-	-	0,45	-	-	-	-	-	-
4-Nonenal	-	-	-	-	0,28	0,03	-	-	0,02	-	-
4-Decenal	-	-	-	-	-	-	0,03	0,03	-	-	-
2-Undecenal	-	-	-	-	1,12	-	-	-	-	-	-
2,4-Decadienal	-	-	-	-	0,51	0,05	-	-	0,02	0,01	-
2,4-Dodecadienal	-	-	-	-	0,95	-	-	-	-	-	-
2-Dodecenal	-	-	-	-	0,49	-	-	-	-	-	-
Tridecanal	-	-	-	0,04	0,21	-	-	-	-	-	-
Ácido Dodecanóico	-	-	0,05	0,03	-	-	-	-	-	-	-
Éster não identificado do Ácido Decanóico	-	-	-	0,1	-	-	-	0,09	-	-	-
2(3H)-Furanone, dihydro-5-(2-octenyl)-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
Pentadecanol	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetradecanona	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Tridecanóico	-	-	0,54	-	-	-	-	0,12	-	-	-

Ácido Tetradecanóico	-	-	0,21	-	1,08	0,23	0,23	-	0,26	0,08	0,2
Hexadecanal	0,04	0,01	-	-	-	0,24	0,07	-	0,03	-	0,06
6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	-	0,01	-	0,36	-	0,03	-	-	-	-	-
14-Methyl-8-Hexadecenal	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptadecanal	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	0,01
Heptadecanol	-	-	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Pentadecanóico	-	-	-	-	-	-	0,05	-	0,07	0,02	0,04
Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	-	-	0,03	0,08	-	0,03	0,02	0,07	0,04	-	0,01
Ácido 9-Hexadecenóico	-	0,59	-	-	1,07	0,98	0,78	1,29	1,7	0,76	1,46
9-Octadecenal	-	-	2,25	-	-	0,41	0,16	-	0,23	-	0,21
Ácido Hexadecanóico	-	2,07	11,97	-	18,24	8,1	4,61	3,27	7,02	5,28	7,06
Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	-	1,56	-	-	-	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	-	-	-	5,23	-	0,17	0,21	0,75	0,2	0,65	0,32
Octadecanal	0,14	0,04	-	0,2	-	0,09	0,14	-	0,16	-	-
Ácido Heptadecanóico	-	0,04	2,93	-	0,25	0,03	0,03	0,4	0,12	0,05	0,11
Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	-	-	-	0,15	-	-	-	0,15	-	-	0,03
Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	0,02	-	-	-	0,04	0,03	0,28	0,11	0,07	0,02
Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	-	-	-	0,01	-	0,16	0,13	0,09	-
Unidentified methyl ester of Octadecnoic acid	-	-	-	-	-	-	-	0,06	0,1	-	-
Metil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	-	0,12	-	-	-	0,14	0,72	-	0,2
Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	-	3,68	2,98	18,34	25,72	24,43	17,39	28,98	20,91
Ácido 9-Octadecenóico	-	20,62	42,9	4,23	3,81	8,16	18,7	15,5	19,17	15,26	18,15
Ácido graxo não identificado de 18C	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-
Ácido Octadecanóico	-	3,82	7,95	2,77	14,86	21,14	24,6	18,86	25,38	18,42	24,03
Hexadecanamida	0,62	2,53	-	-	0,54	-	-	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,51	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54	-

Capítulo 2

Nova caracterização química da secreção glandular de *Salvator merianae* (Squamata, Teiidae)

Abstract. The chemical information present in lizard femoral gland secretions is used in a various social contexts and its chemical composition is known for some species of a few families. Evolutionary history, time of the year, age, sex, health condition, diet and climatic characteristics have all been identified as promoters of chemical variation among populations and species. *Salvator merianae* is a large (SVL > 40 cm in adult males), widely distributed Teiidae that spends long periods inactive inside their burrows. Males and females show between 41 and 51 pores and the chemical characterization of secretions of adult and reproductive captive males indicated an atypical pattern for lizards with large amounts of fatty acids and absence of cholesterol. In this work a new characterization of the secretion of wide *S. merianae* adult males was carried out and information was generated for females and juveniles. Females showed a complex pattern of lipophilic compounds, including odoriferous ones, indicating that they also secrete chemical information that can be used in social contexts. Juveniles also showed high diversity of compounds, but the impossibility of determining sex makes it difficult to discuss the potential functions of certain compounds. Males presented the highest diversity of lipophilic compounds. Like captive males, stearic acid was the most abundant chemical compound and its percentage may be related to sex and quality of the individual. The amount of linoleic acid contrasted with that observed in the literature and may represent differences in diet between free-living and captive males, as well may be related to CRC. Cholesterol was identified in all males and the function of this sterol does not seem to be associated with increased secretion stability or an indicative of size/fighting ability. The characterization of the protein pattern of *S. merianae* secretions could not be determined for all individuals and presented low band diversity. This may be a characteristic of the subfamily Tupinambinae, but also a methodological problem resulting from the low amount of material available.

Keywords. Fatty acids, proteins, semiochemicals, sterols, tegu lizards.

Resumo. As informações químicas presentes nas secreções de glândulas femorais e de lagartos são utilizadas em diferentes contextos sociais e sua composição química foi caracterizada para algumas espécies de poucas famílias. A história evolutiva, época do ano, idade, sexo, condição de saúde, dieta e as características climáticas já foram identificados como promotores de variação química entre populações e espécies. *Salvator merianae* é um Teiidae grande (CRC > 40 cm), de ampla distribuição e que passa longos períodos inativos. Machos e fêmeas apresentam 41-51 poros totais e a caracterização química das secreções de machos adultos e reprodutivos em cativeiro indicaram um padrão atípico e surpreendente para lagartos, apresentando grande quantidade de ácidos graxos e ausência de colesterol. Neste trabalho foi realizada uma nova caracterização da secreção de machos adultos de *S. merianae* de vida livre e geradas informações para fêmeas e juvenis. Fêmeas apresentaram padrão complexo de compostos, incluindo compostos odoríferos, indicando que também secretam informações químicas que podem ser utilizadas em contextos sociais, embora potencialmente de forma menos intensa que os machos. Juvenis também apresentam alta diversidade de compostos lipídicos, porém a impossibilidade de determinar o sexo dificulta a discussão das potenciais funções de determinados compostos. Machos apresentaram a maior diversidade de compostos e o maior número de compostos por indivíduo. Assim como machos de cativeiro, o ácido esteárico foi o mais abundante e sua quantidade pode estar relacionada com o sexo e a qualidade do emissor. A quantidade do ácido linoleico contrastou com o observado na literatura e pode representar diferenças na dieta entre machos de vida livre e machos de cativeiro, assim como sua liberação pode estar relacionada com o CRC. Todos os machos apresentaram colesterol e a função deste composto não parece estar associada ao aumento da estabilidade das secreções ou ser um indicativo de tamanho e habilidade de luta. A caracterização do padrão proteico das secreções de *S. merianae* não pôde ser realizada para todos os indivíduos e apresentou baixa diversidade de bandas. Essa pode ser uma característica das espécies da subfamília Tupinambinae, mas também um problema metodológico resultante da baixa quantidade de material disponível.

Palavras-chave. Ácidos graxos, esteroides, proteínas, semioquímicos, teiú.

Introdução

Os Squamata são animais tipicamente solitários para os quais as interações químicas desempenham um importante papel nas interações sociais (COOPER, 1994; POUGH *et al.*, 2003). As interações químicas entre indivíduos se dão via liberação e recepção de semioquímicos (NORDLUND & LEWIS, 1976) e em lagartos a principal fonte de semioquímicos são as glândulas femorais e pré-anais (COLE, 1966). São estruturas epidérmicas holócrinas, que se conectam ao meio externo através de poros (COLE, 1966) com maior atividade durante a estação reprodutiva e que estão sob influência de hormônios andrógenos.

Estudos realizados nas últimas décadas, principalmente com espécies da família Lacertidae no Velho Mundo, vêm adicionando informações sobre o papel funcional das secreções femorais e pré-anais em lagartos (em detalhes na INTRODUÇÃO GERAL). Estudos têm buscado caracterizar os compostos químicos presentes nessas secreções para acumular informações para um maior número de espécies e compreender os mecanismos envolvidos nas diferenças observadas entre diferentes espécies e/ou populações (MARTÍN & LÓPEZ, 2000; ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003; LÓPEZ & MARTÍN, 2005a; GABIROT *et al.*, 2008, 2010 e 2012; HEATHCOTE *et al.*, 2014; GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a; BAECKENS *et al.*, 2017; GARCÍA-ROA *et al.*, 2017). Atualmente sabemos que uma série de fatores podem estar envolvidos nas diferenças químicas das secreções glandulares de lagartos como, por exemplo, história evolutiva, época do ano, idade, sexo, condição de saúde, dieta e as condições climáticas as quais os indivíduos estão submetidos (em detalhes na INTRODUÇÃO GERAL e nos CAPÍTULOS 1 e 3). Trabalhos sobre glândulas femorais de lagartos são cada vez mais frequentes, porém pouco se sabe sobre o tema para as espécies neotropicais, embora essas informações sejam essenciais para a compreensão da evolução desse sistema sensorial em Squamata e para o uso da composição química das secreções como fonte de informação em estudos filogenéticos.

Salvator e *Tupinambis*, popularmente conhecidos como teiús, são dois gêneros de lagartos da subfamília Tupinambinae (HARVEY *et al.*, 2012), apresentam grande tamanho corporal (podendo atingir até 160 cm de comprimento total) (ANDRADE *et al.*, 2004) e em muitas localidades são caçados por sua carne e sua pele. *Salvator*

merianae é um lagarto de ampla distribuição na América do Sul (ÁVILA-PIRES, 1995), ocorrendo tanto em áreas continentais quanto em algumas ilhas nas quais foi introduzido. Assim como outras espécies de teiús, *S. merianae* apresenta tipicamente um longo período de dormência, normalmente associado aos períodos mais frios do ano, permanecendo ativos durante a primavera e o verão (ANDRADE *et al.*, 2004). Os animais permanecem ativos entre agosto e abril, o período de cópula parece ter início um mês após o início do período de atividade e a partir de fevereiro há queda da atividade até o novo período de dormência, no qual os animais permanecem em suas tocas mesmo em dias que as condições ambientais se mostram favoráveis (LOPES & ABE, 1999; ANDRADE *et al.*, 2004; SAZIMNA, 2015). Informações sobre o comportamento e a biologia de teiús veem principalmente de animais de cativeiro em diferentes localidades da América do Sul e sua generalização deve ser realizada com cautela, pois esses animais ocorrem em locais com condições ambientais que podem apresentar significativa variação.

Machos e fêmeas de *S. merianae* apresentam entre 41 e 52 poros totais (femorais + pré-anais) (HARVEY *et al.*, 2012) e a descrição da morfologia das glândulas foi realizada durante a estação reprodutiva com base em indivíduos adultos de cativeiro na Argentina (CHAMUT *et al.*, 2009). Cilindros de secreção foram observados apenas em machos, coincidindo com diferenças intersexuais relacionadas à territorialidade, embora fêmeas eventualmente fossem observadas esfregando rapidamente a região femoral e pré-anal no substrato (CHAMUT *et al.*, 2009). As glândulas de *S. merianae* seguem o padrão clássico de glândulas femorais de lagartos com produção holócrina de secreção e cada glândula está associada a um poro através do qual a secreção alcança o meio externo (COLE, 1966). Uma particularidade do plugue de secreção da espécie é que, ao contrário do observado em *Ameiva ameiva*, na qual a secreção parece se soltar em pequenos pedaços (IMPARATO *et al.*, 2007), em *S. merianae* a quantidade de queratina torna o plugue menos propenso à fragmentação e a deposição de marcações químicas parece ser um processo ativo (CHAMUT *et al.*, 2009).

Até onde temos conhecimento, *S. merianae* é a única espécie de Teiidae, assim como a única espécie que ocorre no Brasil, para a qual se tem informações na literatura sobre a composição de compostos lipofílicos de sua secreção. Para a composição proteica há dados para *Aspidoscelis tigris*, um Teiidae que não ocorre no Brasil, e para

Iguana iguana, um Iguanidae que também ocorre no Brasil (ALBERTS, 1990 e 1991). Os dados de caracterização química de compostos lipofílicos publicados para machos de *S. merianae* foram obtidos de oito machos adultos de um cativeiro na Argentina em outubro, início do período reprodutivo da espécie na região (MARTÍN *et al.*, 2011). Ácidos graxos são compostos odoríferos que podem ter secreção custosa para o indivíduo e são frequentemente identificados em secreções femorais de Lacertidae (BAECKENS *et al.*, 2017). Machos de *S. merianae* apresentam quantidade atípica dessa classe de compostos, correspondendo a aproximadamente 90% da secreção femoral da espécie, em especial os ácidos 9,12-Octadecanóico (linoleico) e octadecanóico (esteárico) (MARTÍN *et al.*, 2011). A grande quantidade do ácido esteárico não é discutida, mas o ácido linoleico é um ácido essencial para o bom funcionamento do metabolismo, é encontrado em grandes quantidades na gordura e musculatura de *S. merianae* e, teoricamente, só poderia ser secretado em grandes quantidades por indivíduos em boas condições de saúde (MARTÍN *et al.*, 2011). Outro aspecto de interesse é a ausência de colesterol na secreção (MARTÍN *et al.*, 2011). O colesterol tem sido identificado, geralmente em grandes quantidades, desde os primeiros trabalhos que realizaram cromatografia gasosa e espectrometria de massas em secreções femorais de lagartos e sua principal função parece ser a de atuar como uma matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos (ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003). A ausência de colesterol em *S. merianae* foi explicada com base nas características morfológicas dos plugues de secreção, nos quais a queratina e as camadas epiteliais funcionariam como “protetoras” dos semioquímicos (MARTÍN *et al.*, 2011).

Nosso conhecimento sobre as interações químicas em contextos sociais em Teiidae é escasso e os estudos tiveram início apenas em 1999 com experimentos comportamentais realizados com *Pholidoscelis exsul* (BOFILL & LEWIS, 1999), porém há informações de que espécies de Teiidae, incluindo *S. rufescens* e *T. teguixin*, são capazes de detectar itens alimentares com base apenas em informações químicas (COOPER JR., 1990; YANOSKY *et al.*, 1993; COOPER JR. *et al.*, 2002). Somado à ausência de informações para a família de modo geral, os trabalhos com espécies de teiú são dificultados pelo próprio comportamento dos indivíduos que passam longos períodos inativos, fogem rapidamente quando avistam humanos, são agressivos e seu grande tamanho corporal dificulta a realização de experimentos comportamentais por exigir maior infraestrutura. Assim como em *A. ameiva* (COSTA *et al.*, 2010), foi

registrado um caso de necrofilia em *S. merianae* em ambiente natural. Por dois dias consecutivos, dois machos se aproximaram e tentaram copular com uma fêmea recém-morta (SAZIMA, 2015). Antes de dar início à tentativa de cópula, os machos direcionavam dardejadas em direção à cabeça e ao corpo da fêmea morta. A explicação para este comportamento em *S. merianae*, além dos elevados níveis de testosterona no início do período de atividade na região (setembro), também envolve a percepção de feromônios sexuais que ainda estariam ativos (SAZIMA, 2015).

Com base em amostras de secreção femoral de *S. merianae* recebidas de Fernando de Noronha, suplementadas pelas de quatro indivíduos obtidos da Bahia e do Piauí, reavaliamos a composição lipofílica da secreção femoral da espécie e geramos dados de composição proteica. Uma análise inicial de parte desse material revelou um padrão químico que difere, em especial pela presença de colesterol, com o disponível na literatura para uma população em cativeiro na Argentina (MARTÍN *et al.*, 2011). Estes dados preliminares e dados disponíveis sobre a sazonalidade reprodutiva de *S. merianae*, os aspectos envolvidos na composição da secreção em lagartos e a ampla distribuição da espécie, nos levou a refletir sobre os aspectos que poderiam estar envolvidos nessas diferenças. Neste capítulo (1) apresentamos uma nova caracterização dos compostos lipofílicos em secreções de glândulas femorais de machos adultos de *S. merianae* de vida livre (2) e informações inéditas sobre a composição química das secreções glandulares de juvenis e fêmeas adultas, (3) buscando por potenciais explicações para as principais diferenças observadas entre os dados gerados e o apresentado na literatura para a espécie.

Materiais e Métodos

Amostragem

Foram obtidas três amostras de *Salvator merianae* (**Figura 1**) do Parque Nacional da Serra da Capivara (8° 25' S 42° 20' O) (Licença: SISBIO 54599-3), Piauí, e uma do Parque Nacional do Alto Cariri (16° 23' S 40° 01' O) (Licença: SISBIO 54599-3), Bahia em viagens realizadas pelo Laboratório de Herpetologia do IB-USP. Dezesete amostras de machos e fêmeas adultos foram cedidas pelo Dr. Carlos Abrahão, que teve

acesso aos indivíduos em Fernando de Noronha (3° 50' S 32° 25' O), Pernambuco, durante a realização do seu projeto de doutorado. Os indivíduos coletados pelo Laboratório de Herpetologia foram sexados através da observação das gônadas e os de Fernando de Noronha foram sexados e medidos pelo Dr. Carlos Abrahão (**Tabela 1**).



Figura 1. Adulto (esquerda) e juvenil (direita) de *Salvator merianae*. Fotos: Mauro Teixeira Jr.

Tabela 1. Lista dos espécimes de *Salvator merianae* amostrados para secreção femoral. Para cada indivíduo é apresentado, quando disponível, o número de registro de campo (MTR), a localidade na qual foi obtido, o sexo, o comprimento rostro-cloacal (CRC) em centímetros e por qual metodologia foi analisada sua secreção. CG: cromatografia gasosa e espectrometria de massas. GEL: eletroforese em gel.

MTR	Localidade	sexo	CRC	CG	GEL
38840	P.N. do Alto Cariri, BA	J	12,96	X	X
39527	P.N. da Serra da Capivara, PI	J	9,75	X	X
39523	P.N. da Serra da Capivara, PI	J	9,51	X	X
39632	P.N. da Serra da Capivara, PI	M	35	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	28	-	X
-	Fernando de Noronha, PE	F	28	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	33,5	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	F	31	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	F	33	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	34,5	-	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	34,5	-	X
-	Fernando de Noronha, PE	F	26,5	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	F	30	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	31	-	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	31	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	37	-	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	36	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	34	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	36	X	X
-	Fernando de Noronha, PE	M	29,5	X	X

Análise Química

A extração da secreção, sua preparação e a realização da cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS) seguiram o exposto na METODOLOGIA GERAL. Para as amostras que passaram pelas duas metodologias, após a realização da CG-MS, a sobra das amostras dissolvidas em solvente foram transferidas para microtubos de 500 µL e o solvente foi removido por centrifugação a vácuo (*Speed-Vac Savant*). O material obtido seguiu a metodologia de extração de proteínas com acetonitrila 80% ácido trifluoracético 0,05% apresentada na METODOLOGIA GERAL.

Análise estatística

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa sobre presença/ausência de compostos lipofílicos em machos, fêmeas e juvenis de *S. merianae*. Para explorar potenciais diferenças entre o padrão químico dos três grupos em relação à composição lipídica das secreções, foi realizada a análise de PERMANOVA com base em todos os compostos lipofílicos identificados e a seleção dos compostos presentes em três ou mais indivíduos de cada um dos grupos a serem comparados nas demais análises estatísticas apresentadas na METODOLOGIA GERAL.

Resultados

Compostos lipofílicos: juvenis

Os três indivíduos apresentaram gônadas muito pequenas e pouco desenvolvidas, impedindo definir com clareza o sexo e, por este motivo, foram tratados apenas como juvenis. Os juvenis somaram 60 compostos lipídicos identificados (**Tabela 2**): esqualeno, eicosanol, 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, duas amidas, três cetonas, três formas do tocoferol, seis ácidos graxos, sete aldeídos, 10 ésteres e 26 esteroides.

Vinte e dois compostos lipofílicos apresentaram grande variação interindividual, sendo identificados em apenas um dos juvenis. No **J1** (CRC = 9,51 cm) os 10 compostos exclusivos representaram 2,95% da sua secreção e no **J3** (CRC = 12,96 cm)

os sete compostos exclusivos representaram 2,2% da secreção. O **J2** apresentou apenas cinco compostos exclusivos, mas que representaram 20,24% da sua secreção. Onze compostos foram compartilhados pelos três indivíduos, 18 compostos foram compartilhados entre os dois indivíduos provenientes do P.N. da Serra da Capivara e 31 compostos foram compartilhados pelos dois juvenis com maior número de compostos identificados (**J1** e **J3**). O **J2** e o **J3** compartilharam entre si os mesmos 11 compostos compartilhados pelos três indivíduos

Tabela 2. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreção femoral de juvenis de *Salvator merianae*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. J1: MTR39523 e CRC = 9,51 cm. J2: MTR 39527 e CRC = 9,75 cm. J3: MTR38840 e CRC = 12,96 cm.

TR	Compostos	TIC (%)		
		J1	J2	J3
12.4	Nonanal	0,01	-	-
13.2	Nonanal	-	-	0,05
16.2	Decanal	-	-	0,02
18.7	2,4-Decadienal	-	-	0,05
26.6	Dodecanal	0,01	-	0,07
26.9	Ácido Tridecanóico	-	-	0,12
31.0	Hexadecanal	0,04	0,01	0,11
32.4	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	0,03	-	0,15
33.6	3-Heptadecanona	-	-	0,37
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,06	-	0,19
35.1	9-Octadecenal	0,01	0,29	-
35.2	Ácido Hexadecanóico	0,01	2,4	-
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,02	-	0,4
36.9	Ácido Heptadecanóico	-	0,23	-
37.3	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	0,01	-	0,34
37.4	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,13	-	-
37.5	Cetona não identificada	-	-	0,22
37.6	Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,03	-	0,15
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,05	0,04	-
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	4,16	-
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	-	7,31	-
39.0	Ácido Octadecanóico	-	7,82	-
39.4	Hexadecanamida	0,02	-	-
39.6	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	0,01	-	-

39.8	Eicosanol	-	0,72	-
40.1	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,12	-	0,15
40.9	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,3	-	0,38
41.0	9,12-Octadecadienoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester	0,15	-	0,12
43.2	Octadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,23	-	-
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,24	4,02	0,28
47.3	13-Docosenamida	0,17	-	7,69
48.0	Esqualeno	10,47	7,72	0,9
48.2	Cholesta-2,4-diene	0,3	0,17	-
48.3	Derivado do Cholest-2-ene	0,09	0,43	0,52
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,43	3,54	0,3
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	1,33	6,84	0,7
49.0	Cholesta-3,5-diene	1,35	25,95	0,68
50.4	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0,14	0,19	-
50.8	β -Tocoferol	0,05	-	-
51.0	γ -Tocoferol	1,4	-	0,1
51.4	Derivado do Cholestan-3-ol	5,33	-	7,14
51.6	Stigmasta-3,5-diene	0,02	-	-
52.0	Colesterol	47,96	17,88	14,45
52.1	α -Tocoferol	11,52	-	26,62
52.4	Derivado do Colestanol	0,37	-	0,54
52.5	Cholestan-3-one	3,5	3,34	30,46
53.0	Cholest-7-en-3-one	0,11	-	0,5
53.1	Cholesta-3,5-dien-7-one	0,15	1,71	-
53.2	Ergosta-5,22-dien-3-ol	0,05	-	0,34
53.3	Campesterol	1,69	-	-
53.4	Ergostanol	0,62	-	0,31
53.6	Cholest-4-en-3-one	3,11	2,66	1,56
53.7	Ergosta-5,24(28)-dien-3-ol	0,53	-	0,22
54.0	Cholesta-4,6-dien-3-one	3,98	1,88	1,78
54.5	γ -Sitosterol	1,47	-	0,23
54.7	Stigmastanol	0,58	-	0,42
54.8	Lanosterol	0,69	-	-
55.3	Stigmastan-7-one	-	-	1,37
55.9	Cholest-4-ene-3,6-dione	1,01	0,69	-
56.6	Stigmast-4-en-3-one	0,1	-	-

A principal classe de compostos em todos os indivíduos foi a dos esteroides (**Figura 2**) com TIC entre 61,8% e 75,15%. O esteroide mais abundante variou entre os indivíduos: **J1** – colesterol (TIC = 47,96%), **J2** – cholesta-3,5-diene (TIC = 25,95%) e **J3** – cholestan-3-one (TIC = 30,46%). Os ácidos graxos representaram menos de 0,2% das secreções de **J1** e **J3**, mas corresponderam a 21,92% da secreção de **J2** (**Figura 2**).

O juvenil do P.N. Alto Cariri apresentou 7,69% da 13-Docosenamida, enquanto nos juvenis do P.N. Serra da Capivara as amidas representaram menos de 0,2% da secreção (**Figura 2**). Os dois juvenis do P.N. Serra da Capivara compartilharam quantidades significativas de esqualeno (TIC > 7,7%) e os dois juvenis com pouca quantidade de ácidos graxos (**J1** e **J3**) compartilharam grande porcentagem de formas do tocoferol (TIC > 12%) (**Figura 2**).

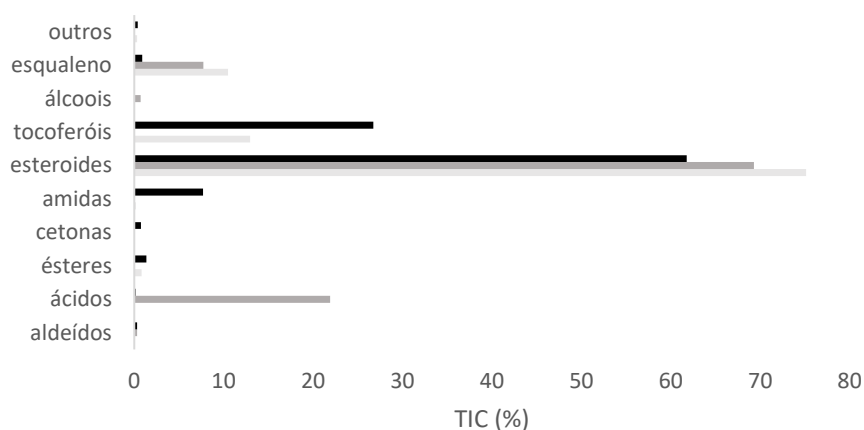


Figura 2. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) das classes de compostos identificadas em juvenis de *Salvator merianae*. J1: cinza claro (P.N. Serra da Capivara). J2: cinza escuro (P.N. Serra da Capivara). J3: preto (P.N. Alto Cariri).

Compostos lipofílicos: fêmeas

Das cinco amostras de secreção femoral de fêmeas, apenas três apresentaram bons resultados. Em uma das amostras (CRC = 26,5 cm) foram encontrados apenas contaminantes e na outra (CRC = 30 cm) foram identificados apenas nove compostos lipofílicos. Cada uma dessas amostras continham menos de cinco cilindros de secreção, dificultando a extração dos compostos lipídicos e afetando a qualidade da CG-MS. Foram identificados 39 compostos lipofílicos nas três fêmeas que apresentaram bons resultados (**Tabela 3**): 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, esqualeno, 6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone, 13-Docosenamida, três formas do tocoferol, quatro aldeídos, quatro ésteres de ácidos graxos, seis ácidos graxos e 18 esteroides.

Dez compostos, representando entre 27,05% e 51,96% das secreções, foram identificados nas três fêmeas. As duas fêmeas com CRC > 30 cm (♀1 e ♀3) compartilharam 11 compostos lipídicos, a ♀1 e a ♀2 compartilharam também 11

compostos e as ♀2 e ♀3 compartilharam 15. Vinte e dois compostos foram identificados em apenas uma das fêmeas. Na ♀1 os oito compostos exclusivos representaram 64,06% da secreção, na ♀2 os 10 compostos exclusivos representaram 21,12% e na ♀3 20,8% da secreção correspondeu a quatro compostos exclusivos (**Tabela 3**).

Tabela 3. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreção femoral de fêmeas de *Salvator merianae* provenientes de Fernando de Noronha, PE. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. ♀1: CRC = 32 cm. ♀2: CRC = 28 cm. ♀3: CRC = 31 cm.

TR	Compostos	TIC (%)		
		♀1	♀2	♀3
4.0	Hexanal	1,24	-	-
29.2	Pentadecanal	0,58	-	-
31.0	Hexadecanal	1,46	1,06	1,42
32.4	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	0,13	0,44	-
35.2	Ácido Hexadecanóico	17,37	-	-
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,51	4,57	0,74
36.1	Octadecanal	0,87	0,89	0,86
36.9	Ácido Heptadecanóico	0,36	-	-
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	2,91	-	-
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	11,5	-	-
39.0	Ácido Octadecanóico	29,7	-	-
39.2	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	11,74	2,78
39.3	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	7,61	1,57
39.6	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	0,83	1,87	0,46
40.7	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	-	3,26	-
40.9	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	2,08	-
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	1,74	0,96	0,92
47.3	13-Docosenamida	-	2,22	-
48.0	Esqualeno	0,4	-	-
48.2	Cholesta-2,4-diene	-	-	0,32
48.3	Derivado do Cholest-2-ene	-	0,42	-
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	2,1	4,55	1,54
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	8,76	-	3,37
49.0	Cholesta-3,5-diene	10,73	3,72	4,25
50.8	β-Tocoferol	-	0,32	-
51.0	γ-Tocoferol	-	0,99	-
51.4	Derivado do Cholestan-3-ol	-	-	0,16

51.6	Stigmasta-3,5-diene	-	1,01	-
52.0	Colesterol	6,81	10,86	36,33
52.1	α -Tocoferol	-	10,59	6,3
52.4	Derivado do Colestanol	-	0,84	-
52.5	Cholestan-3-one	-	1,03	2,1
53.1	Cholesta-3,5-dien-7-one	1,31	3,4	2,68
53.3	Campesterol	0,69	8,01	2,76
53.6	Cholest-4-en-3-one	-	-	18,84
54.0	Cholesta-4,6-dien-3-one	-	7,58	11,12
54.5	γ -Sitosterol	-	4,8	-
54.7	Stigmastanol	-	-	1,48
55.1	4-Campestene-3-one	-	5,18	-

A ♀1 foi a única a apresentar grandes quantidades de ácidos graxos (**Figura 3**), principalmente os ácidos hexadecanóico (TIC = 17,37%), o 9-Octadecenóico (TIC = 11,5%) e o octadecanóico (TIC = 29,7%). Os ésteres representaram 1,34% da secreção da ♀1, 25,79% da ♀2 e 5,55% da ♀3 (**Figura 3**). Os principais ésteres presentes na secreção da ♀2 foram ésteres etílicos dos ácidos hexadecanóico, 9,12-Octadecadienóico e octadecanóico. As ♀2 e ♀3 compartilharam quantidades significativas de formas do tocoferol (♀2: TIC = 11,9% e ♀3: TIC = 6,3%), que não foi identificado na ♀1 (**Figura 3**). A quantidade de esteroides variou bastante entre as fêmeas (**Figura 3**).

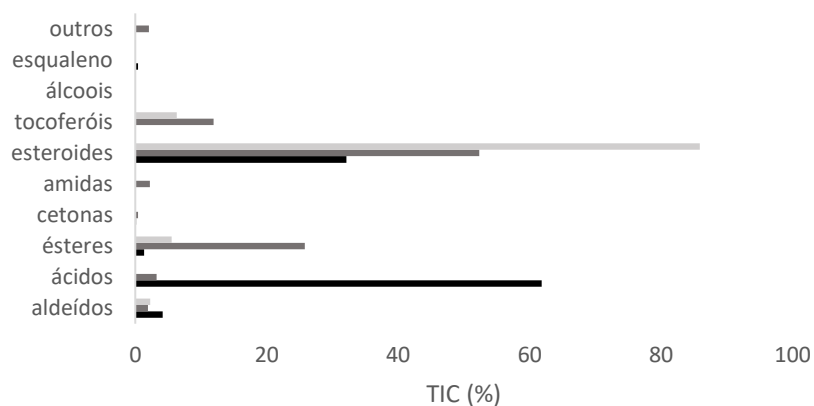


Figura 3. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) das classes de compostos identificadas em fêmeas de *Salvator merianae* provenientes de Fernando de Noronha, PE. ♀1 (CRC = 32 cm): preto. ♀2 (CRC = 28 cm): cinza escuro. ♀3 (CRC = 31 cm): cinza claro.

Na ♀1 foram identificados apenas sete esteroides, que representaram 32,14% da secreção. O esteroide mais abundante nesta fêmea foi o cholesta-3,5-diene (TIC = 10,73%) e o colesterol representou 6,81% da secreção (**Figura 4**). Treze esteroides,

representando 52,36% da secreção, foram identificados na ♀2. O colesterol (TIC = 10,86%) e o campesterol (TIC = 8,01%) foram os dois esteroides mais abundantes na secreção da ♀2. Os 13 esteroides identificados na ♀3 representaram a maior parte de sua secreção (TIC = 85,87%) e os mais abundantes foram o colesterol (TIC = 36,33%), o cholest-4-en-3-one (TIC = 18,84%) e o cholesta-4,6-dien-3-one (TIC = 11,12%) (**Figura 4**).

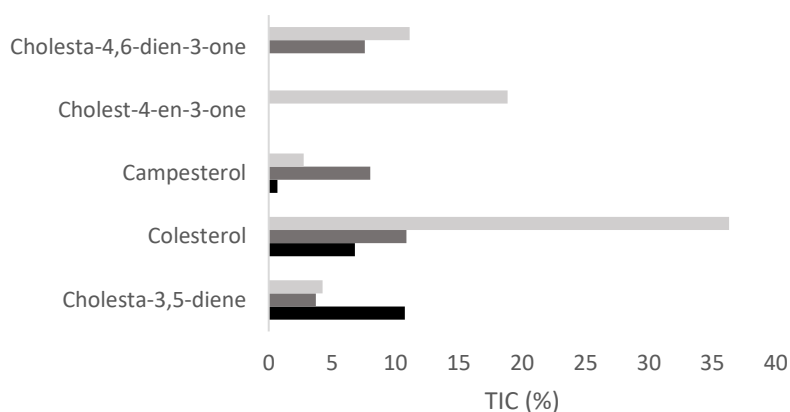


Figura 4. Porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos cinco principais esteroides identificados em fêmeas de *Salinator merianae* provenientes de Fernando de Noronha, PE. ♀1 (CRC = 32 cm): preto. ♀2 (CRC = 28 cm): cinza escuro. ♀3 (CRC = 31 cm): cinza claro.

Compostos lipofílicos: machos

Em três amostras de machos foram identificados menos de 10 compostos lipofílicos. O número de plugues disponíveis para esses indivíduos foi muito baixo dificultando a extração dos compostos lipofílicos. Nas outras cinco amostras de foram identificados entre 17 e 47 compostos lipídicos, totalizando 69 compostos identificados (**Tabela 4**): esqualeno, 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, hexanol, duas cetonas, quatro amidas, quatro formas do tocoferol, 10 ésteres, 11 ácidos graxos, 16 aldeídos e 19 esteroides.

Apenas oito compostos (hexadecanal, 6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone, éster metílico do ácido hexadecanóico, 13-Docosenamida, esqualeno, três esteroides) foram identificados em todos os machos e a porcentagem total destes compostos variou entre os indivíduos (TIC: ♂1 = 9,63%, ♂2 = 65,98%, ♂3 = 32,68%, ♂4 = 16,85% e ♂5 = 51,81%). Onze compostos foram identificados em quatro machos e 12 compostos em três, os demais foram identificados em apenas dois ou um indivíduo. O ♂1 apresentou

14 compostos exclusivos que representaram 6,18% da sua secreção, três compostos foram encontrados exclusivamente no ♂3 e no ♂4 somando, respectivamente, 0,53% e 1,93% e no ♂5 foram sete compostos exclusivos, representando 5,81% da secreção. Os dois machos com mais de 40 compostos (♂1 e ♂5) somaram 62 compostos lipofílicos identificados, sendo 25 presentes em ambos. Os dois machos com 31 e 35 compostos identificados (♂3 e ♂4) somaram 40 compostos e compartilharam 26.

Tabela 4. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreção femoral de machos de *Salvator merianae*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. P.N. Serra da Capivara - ♂1: CRC = 35 cm. Fernando de Noronha - ♂2: CRC = 31 cm, ♂3: CRC = 34 cm, ♂4: CRC = 36 cm e ♂5: CRC = 29,5 cm.

TR	Compostos	TIC (%)				
		♂1	♂2	♂3	♂4	♂5
4.0	Hexanal	0,07	-	4,28	3,38	-
4.2	Hexanol	-	1,58	0,13	0,12	-
9.1	2,4-Nonadienal	-	-	0,15	-	-
12.4	Nonenal	0,05	-	-	-	0,08
13.2	Nonanal	0,03	-	-	-	-
16.2	Decanal	0,04	-	-	-	0,08
18.7	2,4-Decadienal	0,1	-	-	-	0,06
19.6	2-Dodecenal	-	-	-	-	0,09
20.2	Ácido Decanóico	0,04	-	-	-	-
20.8	Aldeído não identificado	-	-	0,21	-	-
26.6	Dodecanal	-	-	-	-	0,35
27.1	Tetradecanal	0,03	-	0,1	0,1	0,36
28.6	Ácido graxo não identificado	-	-	0,17	-	-
29.2	Pentadecanal	0,05	-	0,31	0,24	0,13
30.0	Ácido Tetradecanóico	0,07	-	-	-	-
31.0	Hexadecanal	0,06	1,51	1,28	1,55	2,16
32.4	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	0,09	0,33	0,39	0,14	0,24
32.5	14-methyl-8-Hexadecenal	0,07	-	0,3	0,11	-
32.8	Ácido Pentadecanóico	0,09	-	-	-	-
33.6	3-Heptadecanona	-	-	-	-	0,04
34.1	Heptadecanal	0,05	-	0,16	0,12	0,28
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,3	0,98	0,1	0,06	0,06
35.2	Ácido Hexadecanóico	8,47	-	10,44	17,3	-
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,02	4,35	-	1,32	1,13
36.1	Octadecanal	-	3,01	1,49	1,75	1,72
36.9	Ácido Heptadecanóico	0,64	-	-	0,64	-
37.3	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	-	-	-	-	0,13

38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,23	-	0,55	-	0,1
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	5,19	-	3,12	2,09	-
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	2,38	2,3	2,88	-	-
39.0	Ácido Octadecanóico	59,08	-	21,23	42,52	-
39.2	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	-	-	2,41
39.3	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	10,56	-	-	0,19
39.4	Hexadecanamida	0,09	-	-	-	0,24
39.6	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	-	2,55	1,22	2,49	0,8
39.7	Eicosanal	-	-	-	-	0,32
40.0	Ácido Eicosanóico	0,03	-	-	-	-
40.1	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,13	-	-	-	0,48
40.7	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	0,4	-	-	-	-
40.9	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	-	1,72	1,3	0,58
42.0	9-Octadecenamida	0,09	-	-	-	-
42.2	Octadecanamida	0,37	-	-	-	-
42.7	9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	-	-	-	0,21	-
43.2	Octadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,24	-	-	-	0,43
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	-	2,11	1,12	0,68	0,33
47.3	13-Docosenamida	0,03	15,67	3,1	1,94	2,06
48.0	Esqualeno	0,14	6,24	1,13	0,77	0,54
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,13	-	0,94	0,98	0,37
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	0,4	6,02	3,32	2,35	3,56
49.0	Cholesta-3,5-diene	0,42	8,02	3,12	2,33	1,31
50.4	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0,03	-	1,4	0,94	0,23
50.8	β -Tocoferol	0,04	-	-	-	-
51.0	γ -Tocoferol	0,51	-	-	-	-
51.4	Derivado do Cholestan-3-ol	-	-	-	0,9	-
51.5	Tocoferol não identificado	-	-	-	0,82	-
51.6	Stigmasta-3,5-diene	-	-	0,93	-	0,37
52.0	Colesterol	8,19	27,21	20,24	7,71	41,88
52.1	α -Tocoferol	2,64	-	-	-	-
52.3	Desmosterol	0,54	4,18	2,3	-	-
52.5	Cholestan-3-one	-	3,38	-	-	1,07
52.8	Ergosterol	0,27	-	-	-	-
53.1	Cholesta-3,5-dien-7-one	0,45	-	2,59	1,68	4,11
53.3	Campesterol	0,95	-	2,95	-	6,69
53.6	Cholest-4-en-3-one	3,69	-	1,54	1,17	9,39
54.0	Cholesta-4,6-dien-3-one	-	-	2,49	2,29	5,42
54.5	γ -Sitosterol	0,95	-	2,6	-	5,34
54.8	Lanosterol	1,51	-	-	-	-
55.1	4-Campestene-3-one	0,61	-	-	-	2,4
56.6	Stigmast-4-en-3-one	-	-	-	-	2,47

As principais classes de compostos lipofílicos nas secreções de machos foram aldeídos, ésteres, ácidos graxos, amidas e esteroides, apresentando variação

interindividual (**Figura 5**). Com exceção do ♂1, os aldeídos representaram mais de 4,5% da secreção de machos (**Figura 5**), mas a diversidade de aldeídos não é a mesma em todos os indivíduos. Apenas o ♂2 apresentou grande quantidade de 13-Docosenamida (TIC = 15,67%), nos demais machos as amidas representaram menos de 3,2% das secreções (**Figura 5**). A quantidade de ácidos graxos variou entre 0 e 76,39% (**Figura 5**), entre os machos que apresentaram ácidos graxos em grandes quantidades, os mais abundantes foram o octadecanóico (TIC entre 21,23% e 59,08%), o hexadecanóico (TIC entre 8,47% e 17,3%) e o 9,12-Octadecadienóico (TIC entre 2,09% e 5,19%). Os ésteres representaram entre 0,92% e 18,44% das secreções (**Figura 5**), o maior valor foi observado no ♂2 e mais da metade dos ésteres deste indivíduo correspondeu ao éster etílico do ácido 9,12-Octadecadienóico (TIC = 10,56%). Os esteroides apresentaram ampla variação entre os machos (TIC entre 18,14% e 84,94%) (**Figura 5**). A porcentagem do colesterol variou entre 8,19% e 41,88%, mas este esteroide está entre os quatro compostos mais abundantes de todos os indivíduos.

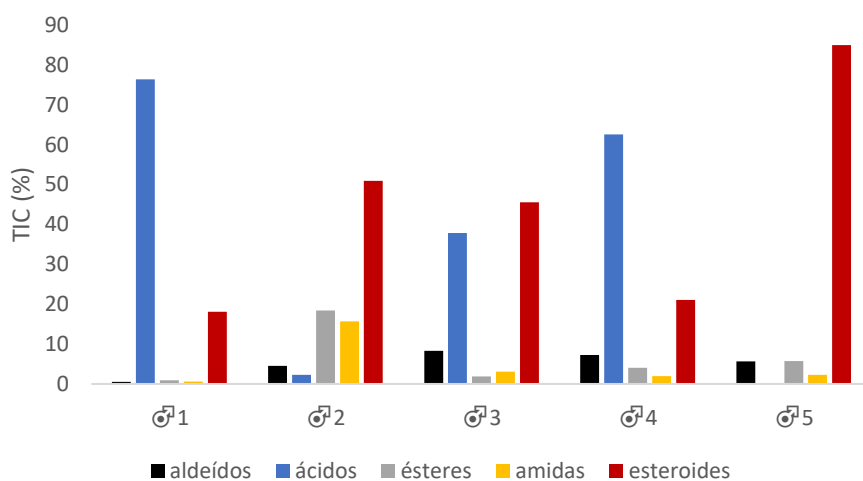


Figura 5. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) das principais classes de compostos identificadas em machos de *Salvator merianae*. P.N. Serra da Capivara - ♂1: CRC = 35 cm. Fernando de Noronha - ♂2: CRC = 31 cm, ♂3: CRC = 34 cm, ♂4: CRC = 36 cm e ♂5: CRC = 29,5 cm.

Compostos lipofílicos: comparações

No total foram identificados 87 compostos lipofílicos em *Salvator merianae*. Vinte e oito compostos foram compartilhados pelos três grupos, representando mais de 93% das secreções de juvenis, 70% de fêmeas e 79% de machos. Trinta e dois compostos foram compartilhados por fêmeas e juvenis e corresponderam a mais de 95%

das secreções de fêmeas e 71% dos juvenis. Apenas dois desses compostos (o derivado do colestanol e o stigmastanol), que representaram menos de 3% das secreções, não foram identificados nos machos. Machos e juvenis compartilharam 43 compostos lipídicos que representaram mais de 80% das secreções dos juvenis e 95% dos machos. Onze desses compostos não foram identificados em fêmeas. Trinta e cinco compostos foram compartilhados por fêmeas e machos, representando mais de 98% das secreções das fêmeas e 93% dos machos. Seis desses compostos não foram identificados nos juvenis. Em relação a porcentagem de cada classe de compostos nas secreções, fêmeas, machos e juvenis diferiram na quantidade de aldeídos (Kruskal-Wallis: $p = 0,03$) e esqualeno (Kruskal-Wallis: $p = 0,03$). Machos e fêmeas não apresentaram diferenças estatísticas entre essas classes de compostos (Mann-Whitney: $U > 0,07$), machos apresentaram maior quantidade de aldeídos do que os juvenis (Mann-Whitney: $U = 0,04$) e juvenis apresentaram maiores quantidades de esqualeno do que fêmeas e machos (Mann-Whitney: $U < 0,05$) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Média e desvio padrão (SD) da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) das classes de compostos lipofílicos identificadas em *Salvator merianae*.

	Juvenis		Fêmeas		Machos	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
aldeídos	0,22	2,84	2,79	1,19	5,25	3,00
ácidos	7,35	12,62	21,70	34,80	35,82	34,54
ésteres	0,73	0,66	10,89	13,07	6,21	7,09
cetonas	0,26	0,42	0,19	0,23	0,25	0,13
amidas	2,63	4,39	0,74	1,28	4,72	6,19
esteroides	68,75	6,69	56,79	27,14	44,11	27,03
tocoferóis	13,23	13,36	6,07	5,95	0,80	1,38
álcoois	0,24	0,42	-	-	0,37	0,68
esqualeno	6,36	4,93	0,13	0,23	1,76	0,68
outros	0,23	0,20	0,69	1,20	0,72	0,77

Considerando todos os compostos identificados, o perfil químico de machos, fêmeas e juvenis apresentou diferenças significativas (PERMANOVA: *pseudo* $F_{2,10} = 1,63$ e $p = 0,04$). Apenas cinco compostos (hexadecanal, derivado do cholest-5-em-3-ol, derivado do cholest-2,4-diene, cholesta-3,5-diene e o colesterol) foram identificados, simultaneamente, nos três juvenis, nas três fêmeas e em três, ou mais,

machos. Esses cinco compostos representaram entre 15,82% e 50,02% da secreção de juvenis, entre 21,15% e 44,46% de fêmeas e entre 8,8% e 46,05% de machos. Apenas o hexadecanal apresentou diferenças estatísticas entre machos, fêmeas e juvenis (ANOVA: $F_{2,10} = 3,83$ e $p = 0,01$), com juvenis apresentando menores quantidades (Teste de Tukey: $p < 0,02$) do que machos e fêmeas, que não apresentaram diferenças entre eles (Teste de Tukey: $p = 0,85$).

Os dois primeiros componentes principais da análise realizada com base nesses cinco compostos, explicou 89,23% da variação entre os grupos (**Figura 6**). O PC1 (68,74%) apresentou correlação significativa e positiva com hexadecanal, com indivíduos adultos apresentando maiores quantidades deste aldeído. O PC2 (20,49%) apresentou correlação significativa e positiva com o derivado do cholest-2,4-diene e não separa tão bem os indivíduos dos três grupos (**Figura 6**). A análise discriminante realizada com os escores dos dois primeiros PCs classificou corretamente 81,82%. Todos os juvenis foram classificados corretamente, mas um macho foi classificado como fêmea e uma fêmea foi classificado como macho.

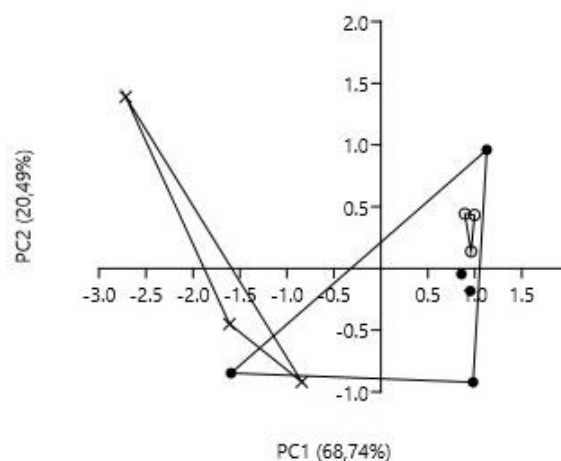


Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação de juvenis (letra X), machos (círculos fechados) e fêmeas (círculos abertos) de *Salvector merianae* com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de cinco compostos lipofílicos.

Considerando apenas indivíduos adultos, dez compostos lipídicos puderam ser utilizados para realizar as análises estatísticas. Esses compostos representaram entre 27,05% e 51,96% das secreções de fêmeas e entre 10,22% e 60,5% de machos. O único composto que apresentou diferenças significativas entre machos e fêmeas foi o octadecanal (ANOVA: $F_{1,7} = 6,18$ e $p = 0,04$), com machos apresentando em média maior quantidade. Os dois primeiros PCs explicaram 88,18% da variação química entre os dois sexos (**Figura 7**). O PC1, responsável por 79,4% da variação, apresentou

correlação significativa e positiva com o éster etílico do ácido hexadecanóico e tanto machos quanto fêmeas apresentaram indivíduos com altos valores para este éster. O PC2 explicou apenas 8,78% da variação entre os dois sexos e apresentou correlação significativa e positiva com os derivados do cholest-5-en-3-ol e do cholesta-2,4-diene, com as fêmeas se concentrando em valores intermediários aos observados pelos machos (**Figura 7**). Os escores desta análise de PCA permitiram classificar corretamente 87,5% dos indivíduos, com apenas uma fêmea classificada erroneamente como macho.

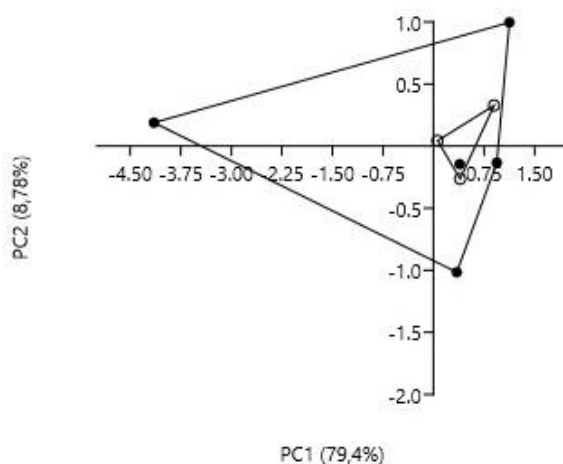


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação de machos (círculos fechados) e fêmeas (círculos abertos) de *Salinator merianae* com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de dez compostos lipofílicos.

Padrão proteico

Com a quantidade de material disponível e levando em consideração as leituras do NanoDrop, foi possível realizar três corridas com 50 µg, 75 µg e 100 µg de proteína total, respectivamente. Das 18 amostras preparadas para eletroforese em gel, incluindo material de dois machos que não haviam passado por CG-MS, apenas duas fêmeas revelaram bandas proteicas em coloração com nitrato de prata. No total, foram identificadas seis bandas de proteínas nas duas fêmeas adultas de *S. merianae* (**Figura 8**) com pesos de, aproximadamente, 15 KDa, 17KDa, 18 KDa, 21 KDa, 24 KDa e 28 KDa. A fêmea de menor tamanho (CRC = 28 cm) apresentou as seis bandas, enquanto a maior (CRC = 31 cm) não apresentou a banda de 17 KDa. A fêmea que apresentou cinco bandas proteicas, também as apresentou em intensidade muito mais baixa do que a outra. As três bandas de proteínas mais intensas são as de 17 KD, 18 KDa e 21 KDa.

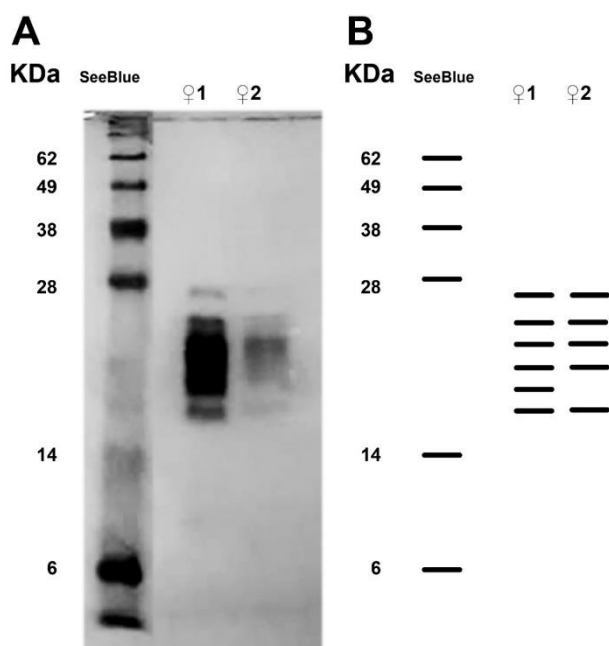


Figura 8. Padrão de bandas proteicas de duas fêmeas adultas de *Salvator merianae* e marcador de peso molecular SeeBlue. (A) Imagem original da eletroforese em gel SDS-PAGE em coloração com nitrato de prata e (B) mapa indicando as bandas que podem ser observadas no gel. ♀1: CRC = 28 cm. ♀2: CRC = 31 cm.

Discussão

Embora de grande tamanho corporal e apresentando algumas dezenas de poros, amostras da secreção de *Salvator merianae* pesaram menos do que 1,4 mg por indivíduo. Tive a oportunidade de retirar material de apenas um macho adulto, além dos três juvenis, mas pude perceber que, mesmo em um indivíduo com CRC de 36 cm, é bastante difícil obter a secreção da espécie. Enquanto nas outras espécies de Teiidae estudadas neste trabalho, a secreção se projeta com facilidade para o meio externo e se apresenta com uma consistência mais pastosa, a secreção de *S. merianae* exige maior força para ser extraída e é mais dura. Mesmo com toda a tecnologia dos equipamentos de cromatografia gasosa e espectrometria de massas, que permite detectar compostos em concentrações bastante baixas, este pode ter sido um aspecto que influenciou os resultados obtidos neste capítulo.

O padrão proteico de *S. merianae* foi identificado apenas para duas amostras e mostrou baixa diversidade de bandas proteicas quando comparado com outras espécies apresentadas ao longo deste trabalho. Três possibilidades podem explicar a baixa diversidade de proteínas na espécie. A primeira delas é que tivemos grandes dificuldades em atingir a concentração apresentada na METODOLOGIA GERAL para as amostras de *S. merianae* e essas amostras já haviam passado por CG-MS. Ao contrário dos equipamentos utilizados nas análises dos compostos lipofílicos, a eletroforese em gel exige maior concentração de material para que se possa visualizar com clareza bandas proteicas (BASSAM *et al.*, 1991). Baseado nesta possibilidade, a baixa diversidade de proteínas pode ser reflexo da baixa concentração e não um evento biológico real. A segunda possibilidade envolve dados que serão apresentados no CAPÍTULO 5, com os resultados parciais para *Crocodilurus amazonicus* e *Tupinambis teguixin*, outras duas espécies da subfamília Tupinambinae (HARVEY *et al.*, 2012). Para *C. amazonicus* não conseguimos observar bandas e para *T. teguixin* conseguimos para um indivíduo e as bandas só puderam ser observadas após coloração em nitrato de prata. O observado para essas três espécies abre a possibilidade de que esta dificuldade pode ser um reflexo de características das espécies da subfamília que podem apresentar menor diversidade de bandas ou proteínas que ocorrem em quantidades muito baixas. A terceira possibilidade é a de que a espécie presente, principalmente, proteínas com mais de 198 KDa e menos de 3 KDa e não aparecem no gel porque não entraram ou saíram do mesmo. Essa explicação parece pouco provável porque (1) antes de optar por géis de 15% de poliacrilamida fizemos testes com géis de 12% e 20%, (2) as demais espécies estudadas apresentam bandas entre esses dois valores e (3) esses valores são bem discrepantes do que atualmente conhecemos para secreções de lagartos (ALBERTS, 1991; MANGIACOTTI *et al.*, 2017 e 2019). Comparações do padrão de bandas proteicas de fêmeas de *S. merianae* com o macho de *T. teguixin* e com os Teiinae analisados durante este projeto serão apresentados na DISCUSSÃO GERAL.

O perfil proteico de um dos machos de *Aspidoscelis tigris* obtidos durante a primavera apresentou uma banda proteica de aproximadamente 20 KDa, alguns componentes com menos de 14 KDa e perfil com diferenças bem marcadas em relação às três espécies de Iguanidae analisadas no mesmo trabalho (ALBERTS, 1990). Um segundo macho revelou sete bandas entre 12,5 KDa e 56 KDa (ALBERTS, 1991). Nesses dois trabalhos não há uma discussão acerca do padrão proteico de *A. tigris*,

apenas a constatação de que seu padrão de proteínas difere do observado em espécies de outras famílias. Em *Podarcis muralis* (Lacertidae) foi identificada maior diversidade de bandas de proteínas (MANGIACOTTI *et al.*, 2017), assim como em *Iguana iguana* (Iguanidae) (ALBERTS *et al.*, 1993) e as duas espécies apresentaram variação interindividual na presença/ausência de determinados componentes proteicos. O padrão de proteínas de *S. merianae* apresentou convergências com o de *A. tigris*, com bandas de proteínas se posicionando em valores menos frequentes nas espécies de outras famílias para as quais se têm informação. Em *S. merianae* também foi observada variação entre indivíduos, seja na possibilidade de visualizar as bandas na eletroforese, assim como entre as duas fêmeas que apresentaram bandas (banda de 17 KDa foi observada apenas na fêmea de menor CRC). As duas fêmeas nas quais identificamos as proteínas foram justamente aquelas que não apresentaram ácidos graxos em suas secreções. Não observamos bandas de proteínas nos machos de *S. merianae* e entre as amostras analisadas tanto por eletroforese em gel, quanto por CG-MS, os machos apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos. Mais amostras precisam ser analisadas, e em diferentes momentos do período de atividade de *S. merianae*, para testar se há relação entre o estado reprodutivo, a quantidade de ácidos graxos e a intensidade das bandas proteicas.

Os resultados obtidos neste trabalho identificaram um total de 87 compostos lipofílicos na espécie, que há variação no padrão quando comparamos juvenis, fêmeas e machos e que os compostos compartilhados pela maioria dos indivíduos são fontes de informações que nos permitem prever com certo grau de confiabilidade o sexo e/ou faixa etária dos indivíduos de *S. merianae*. Há variação individual no número de compostos lipídicos e/ou na porcentagem dos compostos compartilhados em juvenis, fêmeas e machos, há indivíduos com grandes quantidades de ácidos graxos e o colesterol está presente em todos. Os resultados podem ser discutidos, tanto em relação as diferenças entre os três grupos comparados neste capítulo, quanto em relação as diferenças encontradas entre machos de vida livre e machos de cativeiro analisados no trabalho de MARTÍN e colaboradores (2011).

No trabalho de caracterização das glândulas femorais de *As. merianae*, os cilindros de secreção não foram observados em fêmeas e os autores consideraram que este seria um aspecto coerente com as diferenças de territorialidade entre os dois sexos

(CHAMUT *et al.*, 2009). Durante nosso processo de amostragem obtivemos, não apenas material de fêmeas, como também de jovens. Em cativeiro as fêmeas ocasionalmente são observadas esfregando a região das glândulas no substrato, porém de forma mais rápida do que os machos adultos (CHAMUT *et al.*, 2009) e a observação de um caso de necrofilia na espécie evoca a possibilidade de que fêmeas estejam produzindo feromônios sexuais (SAZIMA, 2015). A presença de diversos compostos tipicamente reconhecidos como semioquímicos em lagartos (WELDON *et al.*, 2008), assim como a grande quantidade de compostos odoríferos, como ácidos graxos e ésteres, que apresentam maior volatilidade e, conseqüentemente, aumentam a possibilidade de detecção da informação (ALBERTS, 1992b; BAECKENS *et al.*, 2017) em duas das fêmeas amostradas, convergem com a ideia de que fêmeas adultas de *S. merianae* estão produzindo informações químicas que podem ser importantes em contextos sociais.

Infelizmente não possuímos dados referentes ao estado reprodutivo das fêmeas amostradas, mas levando em consideração a literatura, onde é registrado que fêmeas do sudeste brasileiro encontram-se grávidas do meio para o final de outubro (LOPES & ABE, 1999; ANDRADE *et al.*, 2004), é provável que à época da coleta dessas amostras (janeiro-fevereiro), as fêmeas não estivessem mais receptivas para cópulas, porém não há como determinar se já haviam passado pelo período de postura. Em fêmeas de *Ameiva ameiva* encontramos grandes quantidades de ácidos graxos apenas nas que apresentaram ovos fecundados (CAPÍTULO 1) e sugerimos que esta poderia ser uma estratégia para sinalizar aos machos da espécie que a fêmea não está mais disponível para cópula. O mesmo pode ocorrer em *S. merianae*, com fêmeas aumentando a volatilidade de suas secreções, assim como compartilhando maiores similaridades com a secreção dos machos, para evitar cópulas forçadas (CENSKY, 1997; LE GALLIARD *et al.*, 2005). As observações comportamentais de SAZIMA (2015) dão suporte à esta hipótese, uma vez que dois machos copularam “forçosamente” com o cadáver de uma fêmea potencialmente reprodutiva. Uma das fêmeas de *S. merianae* apresentou grandes quantidades de cholest-4-en-3-one e cholesta-4,6-dien-3-one, assim como as fêmeas de *A. ameiva* que apresentaram folículos em vitelogênese secundária (CAPÍTULO 1). Esses dois esteroides são produtos da oxidação do colesterol, apresentando maior estabilidade no meio, e, ao menos, o cholest-4-en-3-one está associado com a inibição do ganho de peso e acúmulo de corpos adiposos em ratos (SUZUKI *et al.*, 1998). Não podemos garantir que o ciclo reprodutivo de *S. merianae* em Fernando de Noronha

(Pernambuco) similar ao de populações do sudeste (LOPES & ABE, 1999; ANDRADE *et al.*, 2004). Caso a reprodução da espécie possa ser prolongada sob condições climáticas distintas, é possível que a quantidade desses dois esteroides esteja relacionada com o aumento do consumo energético para a produção de folículos e ovos.

Os juvenis amostrados de *S. merianae*, embora apresentassem CRC inferior a 13 cm e gônadas não desenvolvidas, apresentaram mistura complexa de compostos lipídicos, variando entre 23 e 38 compostos por indivíduo. Um deles apresentou quantidade significativa dos ácidos 9-Octadecenóico (oleico) e octadecanóico (esteárico). Essa quantidade de ácidos não é consequência (1) do tamanho corporal, já que o indivíduo apresentou tamanho intermediário comparado aos outros que não apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos, (2) de diferenças nas condições ambientais, já que é da mesma localidade do indivíduo com o CRC similar e ambos foram coletados na mesma semana e (3) da qualidade da análise de CG-MS, já que os outros indivíduos apresentaram maior número de compostos lipídicos identificados. Ainda entre os juvenis, os dois indivíduos da Caatinga compartilharam maiores porcentagens de esqualeno, os dois que não apresentaram ácidos graxos compartilharam grandes quantidades de α -Tocoferol (vitamina E) e o esteroide mais abundante variou entre eles. O esqualeno é um antioxidante que pode atuar na proteção dos demais semioquímicos presentes nas secreções em espécies de ambientes úmidos (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a), assim como sinaliza sexo e está associado com o aumento de agressividade em uma espécie de anfisbenas (LÓPEZ & MARTÍN, 2009). Com base nas funções conhecidas para o esqualeno, é curiosa a quantidade do composto nos dois indivíduos da Caatinga que habitam locais mais secos, menos propensos à oxidação dos compostos presentes nas secreções, e por serem indivíduos jovens não se engajam em confrontos agonísticos. A vitamina E pode indicar a qualidade da dieta do indivíduo e apresentar significativa variação (individual, populacional, filogenética) (WELDON *et al.*, 2008; MARTÍN & LÓPEZ, 2010a). A grande quantidade de vitamina E em um juvenil da Caatinga e um de Fernando de Noronha e a sua completa ausência no outro juvenil da Caatinga nos permite afirmar que a porcentagem deste composto em juvenis de *S. merianae* não está relacionada com diferenças genéticas entre as populações e com variações na disponibilidade de alimento.

Apenas um macho adulto de *S. merianae* apresentou poucos compostos (17 no total), mas apresentou grandes quantidades de ésteres de ácidos graxos, amidas e esqualeno. Esse padrão foi bastante diferente do observado nos três machos que apresentaram grande quantidade de ácidos graxos e no quarto macho com grande quantidade de esteroides. Como este indivíduo foi também o único a apresentar baixo número de compostos, não podemos excluir a possibilidade de que este padrão seja reflexo de uma má extração dos compostos lipídicos presentes na secreção. Como a quantidade de cada composto é dada pela porcentagem relativa à corrente total de íons de todos os compostos incluídos, um menor número de compostos aumenta os valores das porcentagens dos compostos identificados, principalmente os que aparecem em maior intensidade no cromatograma. O mais curioso deste macho é que o éster mais abundante é justamente o éster etílico do ácido 9-Octadecenóico, que é derivado de um ácido que não foi identificado por MARTÍN e colaboradores (2011) e representa menos de 3% das secreções dos outros machos analisados neste capítulo. O menor macho (CRC = 29,5 cm) apresentou 41 compostos lipídicos, mas os esteroides representaram mais de 84% da sua secreção. A idade/tamanho pode explicar as diferenças com os demais machos.

Nos machos que apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos, foram identificados 59 compostos lipídicos. Trinta e um desses compostos também foram identificados nos machos de cativeiro da Argentina (MARTÍN *et al.*, 2011): esqualeno, 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, 6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone, três formas do tocoferol, três ésteres, sete aldeídos, sete ácidos graxos e oito esteroides. Antes de discutir as diferenças observadas na composição química das secreções de machos de *S. merianae* entre os nossos resultados e os de MARTÍN e colaboradores (2011) é importante ressaltar que os dados publicados referem-se a indivíduos criados em cativeiro, com controle de dieta especial para a estação reprodutiva, CRC superior aos 40 cm, com área de vida limitada, que não entram em contato com outro macho e compartilham o espaço com cinco ou seis fêmeas, enquanto os nossos dados são provenientes de indivíduos com CRC entre 34 e 36 cm, de vida livre, com ampla área de vida, que provavelmente entram em confrontos com outros machos e precisam disputar pelo acesso a fêmeas. Esses três machos, embora tenham apresentado grandes quantidades de ácidos graxos (TIC > 37%), apresentaram significativas quantidades de

esteroides (TIC > 18%) quando comparados com os machos de cativeiro (média da TIC = 3,2%).

O principal ácido graxo identificado nos machos de cativeiro foi o esteárico (média da TIC = 57,78%) e este foi também o mais abundante nos machos de vida livre (TIC entre 21,23% e 59,08%). Embora este ácido graxo seja observado frequentemente em secreções femorais de lagartos, até o presente momento só havia sido detectado em porcentagens tão elevadas em *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011) e agora em outros Teiidae (dados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto). Por ser um ácido graxo saturado e com cadeia formada por 18 carbonos, pode ser considerado um ácido relativamente estável à degradação em ambientes de temperaturas mais elevadas (ALBERTS, 1992b), porém sua exata função em contextos sociais de lagartos ainda é pouco compreendida. Em *Acanthodactylus boskianus* (Lacertidae) a quantidade do ácido esteárico parece ser um sinalizador de sexo (machos apresentam maior quantidade) (KHANNON *et al.*, 2011b), em *Iberolacerta cyreni* (Lacertidae), quando controlado o efeito do tamanho corporal, a quantidade do ácido esteárico é inversamente proporcional ao *status* de dominância (MARTÍN *et al.*, 2007) e em *P. muralis* o aumento da quantidade desse ácido está relacionada com maior quantidade de parasitas, sendo um indicativo do *status* de saúde do indivíduo (MARTÍN *et al.*, 2008). MARTÍN e colaboradores (2011) não apresentam explicações para a quantidade do ácido esteárico em machos de *S. merianae*, mas nossos resultados permitem discutir algumas possibilidades. Os três machos analisados neste capítulo apresentam CRC similar e são menores do que machos considerados grandes, mais velhos e mais experientes (SAZIMA, 2015) e apresentaram menores quantidades deste ácido do que os machos de cativeiro que eram bem maiores (MARTÍN *et al.*, 2011). Com base nessas informações, é pouco provável que em machos de *S. merianae* a porcentagem de ácido esteárico seja inversamente proporcional ao *status* de dominância dos indivíduos, porém experimentos comportamentais são necessários para confirmar que machos mais dominantes apresentam maior quantidade deste ácido. Também podemos excluir que o aumento da quantidade de ácido esteárico esteja relacionado com piores condições de saúde em *S. merianae*, assim como ocorre em *P. muralis* (MARTÍN *et al.*, 2008), já que machos de cativeiro, com controle de dieta e acompanhamento de veterinários, apresentaram maiores quantidades do ácido. A possibilidade de que este composto esteja relacionado com o sexo dos indivíduos permanece em aberto e precisa ser testada

com o aumento da amostragem de fêmeas, pois em nossos resultados, a fêmea que apresentou o ácido esteárico o tinha em maior porcentagem do que um dos machos (29,7% x 21,23%).

O ácido hexadecanóico (palmítico) representou entre 8,47% e 17,3% da secreção dos machos de vida livre, mas representou apenas $7,34 \pm 0,48\%$ da secreção de machos de cativeiro (MARTÍN *et al.*, 2011). Esse ácido também é o mais abundante em secreções de *Liolaemus* (Liolaemidae) (ESCOBAR *et al.*, 2001), em *I. iguana*, dentro e fora da estação reprodutiva (ALBERTS *et al.*, 1992), e em *Blanus cinereus* (Amphisbaenia) (LÓPEZ & MARTÍN, 2005b). Embora seja frequentemente encontrado nas secreções femorais de lagartos, há poucos trabalhos que sugerem funções para este ácido nas secreções de lagartos. O ácido palmítico, assim como o esteárico, está relacionado com piores qualidades de saúde em *P. muralis* (MARTÍN *et al.*, 2008), mas indica melhor simetria e menores níveis de estresse em *I. cyreni* (ARAGÓN *et al.*, 2008). Para avaliar seu papel em *S. merianae* seria necessário realizar análises morfométricas dos indivíduos amostrados, assim como experimentos que permitissem avaliar a qualidade do sistema imune e os níveis de estresse. Ainda em relação aos ácidos graxos, a principal diferença entre indivíduos de cativeiro e de vida livre é a quantidade do ácido linoleico. Em cativeiro esse ácido representa mais de 20% da secreção (MARTÍN *et al.*, 2011), enquanto nos machos de vida livre correspondeu a menos de 5,5%. Ácidos insaturados, como o linoleico, são encontrados em maior quantidade durante a estação reprodutiva de certos Iguanidae, aumentando a volatilidade e, potencialmente, a detectabilidade das informações químicas (ALBERTS, 1992b). O ácido linoleico é um ácido abundante na gordura e na musculatura de *S. merianae* (CALDARONI & MANES, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009) e é considerado essencial para o metabolismo e não pode ser sintetizado a partir de outros componentes da alimentação, precisando ser ingerido diretamente na dieta (BURR *et al.*, 1930). Sua potencial função, ainda não testada, em machos de *S. merianae*, seria a de sinalizar a qualidade do macho, uma vez que apenas machos em boas condições de saúde seriam capazes de secretá-lo em elevadas quantidades (MARTÍN *et al.*, 2011). Considerando que esta hipótese esteja correta, a diferença significativa na quantidade do ácido linoleico entre machos selvagens e de cativeiro pode ser explicada por diferenças na dieta, uma vez que machos de cativeiro conseguem secretar elevadas quantidades deste ácido por receberem uma dieta controlada de acordo com suas necessidades e não passam por períodos de privação de

alimento, mostrando que esta não seria uma característica natural da espécie. Outra explicação possível seria a de que machos maiores, mais territorialistas e com maior sucesso em encontros agonísticos, aumentariam sua quantidade para tornar a secreção mais volátil, permitindo maior alcance, e indicar sua qualidade para outros machos próximos ao seu território.

As últimas diferenças marcantes entre a secreção de machos de cativeiro e selvagens estão nos esteroides. Dos 19 esteroides presentes nas secreções dos machos de cativeiro, oito não puderam ser identificados (MARTÍN *et al.*, 2011), dificultando a comparação da diversidade de esteroides entre os dois grupos. Outra diferença é o quanto essa classe de compostos é representativa nas secreções, citada anteriormente nesta discussão. E, por fim, a diferença mais significativa é a presença de colesterol nos indivíduos de vida livre. Em várias outras espécies de lagartos, a principal função do colesterol é a de agir como uma matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos (ESCOBAR *et al.*, 2003). A principal função do colesterol, a sua baixa quantidade na carne (CALDARONI & MANES, 2006) e a presença de queratina e camadas epiteliais nas secreções de *S. merianae*, levou MARTÍN e colaboradores (2011) à hipótese de que a ausência de colesterol na espécie poderia ser consequência de baixa quantidade do composto disponível para ser secretado e a presença de outro mecanismo que garantiria a estabilidade dos semioquímicos no meio (queratina e camadas epiteliais). Colesterol também foi identificado em todas as outras espécies de Teiidae aqui estudadas, tornando a ausência deste esteroide nos animais de cativeiro ainda mais estranha. É importante ressaltar que a presença do colesterol em nossas amostras não é um erro de identificação, uma vez que sua identificação foi confirmada tanto pelo Dr. Jose Martín, quanto pelo Dr. Márcio Nardelli, técnico em CG-MS do Instituto de Química da USP. Os três machos que apresentaram ácidos graxos, apresentaram também menores quantidades de colesterol, porém a porcentagem chegou a aproximadamente 20% da secreção em um deles. Se a função do colesterol em *S. merianae* fosse a de agir como um reforço positivo da estabilidade dos compostos, esperaríamos que as maiores quantidades fossem observadas justamente nos indivíduos com maiores quantidades de ácidos graxos, que são compostos com maior volatilidade (ALBERTS, 1992b; BAECKENS *et al.*, 2017). Em *A. boskianus* o aumento de colesterol sinaliza força entre machos e elicit agressividade (KHANNON *et al.*, 2011b) e em *A. arythrurus* machos mais velhos tendem a ter menor quantidade do esteroide (LÓPEZ & MARTÍN, 2005a).

Em *I. monticola* (Lacertidae), embora o colesterol também esteja relacionado com a capacidade de luta e comunicação entre machos (MARTÍN & LÓPEZ, 2007), fêmeas não parecem escolher machos com base na quantidade deste esteroide (MARTÍN & LÓPEZ, 2006c). Parece pouco provável que diferenças na quantidade de colesterol sinalize diferentes habilidades de luta em machos de *S. merianae*, pois há uma diferença de quase 30% em dois machos que apresentaram apenas 1 cm de diferença no CRC.

O exposto neste capítulo adiciona novas informações ao que sabemos sobre as secreções glandulares de lagartos, principalmente mostrando diferenças entre animais de cativeiro e de vida livre que podem ser explicadas por diferenças de comportamento, tamanho e dieta. Assim como dados apresentados nos outros capítulos, a grande quantidade de ácidos graxos parece estar associada ao estado reprodutivo dos Teiidae e essa informação deve ser levada em consideração quando buscarmos compreender os aspectos evolutivos deste sistema sensorial de lagartos e quando, futuramente, este tipo de informação for incluída em análises filogenéticas para que não sejam realizadas comparações inadequadas, gerando confusões nas filogenias.

Conclusões

- Foram identificadas seis bandas de proteínas, entre 15 KDa e 28 KDa, em apenas duas amostras de fêmeas e em coloração com nitrato de prata, indicando baixa quantidade de material.
- Foram identificados 87 compostos lipídicos nas secreções de *Salvator merianae* e a composição química das secreções parece ser uma boa ferramenta para predizer a idade e o sexo dos indivíduos.
- Fêmeas apresentam padrão complexo de compostos lipídicos, indicando que também utilizam esse sistema em interações sociais, aparentemente de forma menos intensa que os machos.
- Juvenis apresentaram elevada diversidade de compostos e padrões discrepantes que não puderam ser mais bem comparados pela impossibilidade de identificar o sexo de

cada indivíduo. Um aspecto interessante em juvenis foi a elevada quantidade de esqualeno (antioxidante) nas amostras provenientes da Caatinga (ambiente seco).

- Dois machos não apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos em suas secreções. A ausência de ácidos graxos no macho de menor CRC pode ser consequência do tamanho, idade e/ou estado reprodutivo. O outro macho apresentou apenas 17 compostos lipídicos e grandes quantidades do éster etílico do ácido 9-Octadecenoico, para este macho não descartamos que este padrão seja consequência de problemas metodológicos.

- Em machos, o ácido mais abundante foi o octadecanoico (esteárico), também o mais abundante em animais de cativeiro. Em machos de *S. merianae*, esse ácido não parece estar inversamente relacionado com o *status* de saúde ou de dominância, porém pode ser um indicativo de sexo e qualidade do indivíduo.

- O ácido hexadecanoico (palmítico) foi identificado em quantidades que tendem a ser maiores em machos de vida livre do que os de cativeiro e dados morfométricos e comportamentais são necessários para avaliar se a quantidade deste ácido está correlacionada com simetria ou níveis de estresse, respectivamente.

- O ácido 9,12-Octadecadienoico (linoleico) representou menos de 5,5% da secreção dos machos estudados neste trabalho, mas representam mais de 25% da secreção de machos de cativeiro. Essa diferença pode ser explicada, tanto pela dieta controlada e acompanhamento de veterinários, quanto pelo tamanho dos machos e sua qualidade, uma vez que os machos de cativeiro eram significativamente maiores do que os machos amostrados neste capítulo.

- Machos de vida livre apresentaram colesterol. Parece haver uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de ácidos graxos e a de colesterol, indicando que na espécie a função deste composto deve ser outra que não a de matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos. Também parece pouco provável que a quantidade de colesterol esteja relacionada com tamanho/idade/habilidade de luta, pois os CRC são muito parecidos e as diferenças no colesterol ultrapassam os 20%.

Capítulo 3

Caracterização da secreção de glândulas femorais e reconhecimento químico em três espécies de *Ameivula* (Squamata, Teiidae) da Caatinga brasileira

Abstract. Femoral gland secretions are the major source of lizard semiochemicals and three main mechanisms are involved in promoting changes in the composition of secretions: diet, climatic conditions and genetics. *Ameivula* is a taxonomically complex genus whose diagnosis changed in recent years oriented by molecular data. Many species remain to be described, particularly in the Brazilian Caatinga, one of its diversity hotspot. *Ameivula pyrrhogularis* and two other species of this semiarid region (not yet formally described) present significant morphological variation in a small area and molecular data indicate that they form a potential hybrid complex. In this chapter we performed the characterization of the femoral gland secretions (lipids and proteins) of the three species, as well as a behavioral experiment to test the chemical recognition among them, seeking for a better understanding of the *Ameivula* diversity in the Caatinga and investigate new evidence for the potential existence of a hybrid species. Two females of *A. pyrrhogularis* showed a complex pattern of lipophilic compounds and compounds that were not identified in males, indicating that this information can be used in social contexts that still need to be tested. Males of *A. pyrrhogularis* presented higher number of femoral pores and sexual selection seems to be a possible explanation for these pattern. In most males, fatty acids were the most abundant class of lipophilic compounds and may be associated with the reproductive status, increasing the volatility of secretions during the mating season. Chemical composition seems to be a good predictor of the species, but it is less efficient to categorize males with large amounts of fatty acids and this pattern may allow matings between different species. The behavioral experiment showed that only males of *Ameivula sp. nov. 1* had greater interest in secretions of their own species and greater aggressiveness towards males of the other two species, these aspects that may also interfere with reproductive isolation among the three species.

Keywords. *Ameivula pyrrhogularis*, hybrid species, reproductive isolation, tongue-flicks.

Resumo. As secreções de glândulas femorais são a principal fonte de semioquímicos em lagartos e três mecanismos principais estão envolvidos na promoção de alterações na composição das secreções: dieta, fatores ambientais e genética. *Ameivula* é um gênero de taxonomia complexa para o qual as diagnoses, orientadas por dados moleculares, foram alteradas nos últimos anos. Muitas espécies do gênero ainda precisam ser descritas, principalmente na Caatinga brasileira, uma das áreas de maior diversidade do gênero. *Ameivula pyrrhogularis* e mais duas espécies da Caatinga ainda não formalmente descritas, apresentam significativa variação morfológica em uma área pequena e dados moleculares indicam formar um potencial complexo híbrido. Neste capítulo realizamos a caracterização (lipídica e proteica) da secreção femoral das três espécies, assim como um experimento comportamental para testar o reconhecimento químico entre elas, buscando uma melhor compreensão da diversidade do gênero na Caatinga e investigamos novas evidências para a potencial existência de um híbrido. Duas fêmeas de *A. pyrrhogularis* apresentaram padrão complexo de compostos lipofílicos e compostos que não foram identificados nos machos da espécie, indicando que essas informações podem ser utilizadas em contextos sociais que ainda precisam ser testados. Machos de *A. pyrrhogularis* apresentaram maior número de poros femorais e a seleção sexual parece ser a explicação mais adequada para esse padrão. Na maioria dos machos das três espécies, os ácidos graxos foram a classe mais abundante de compostos lipofílicos e esses compostos podem estar associados ao momento reprodutivo, aumentando a volatilidade das secreções durante a estação reprodutiva. A composição química parece ser um bom preditor da espécie, porém é menos eficiente para categorizar os machos com grandes quantidades de ácidos graxos e esse padrão pode permitir a ocorrência de cruzamentos entre as diferentes espécies. O experimento comportamental demonstrou que os machos de *Ameivula sp. nov. 1* apresentaram maior interesse por secreção da própria espécie e maior agressividade para com machos das outras duas espécies, aspectos que também podem interferir no isolamento reprodutivo entre as três espécies.

Palavras-chave. *Ameivula pyrrhogularis*, dardejadas, espécies híbridas, isolamento reprodutivo.

Introdução

A capacidade de se obter informações através de sentidos químicos é uma característica amplamente distribuída no reino animal (WYATT, 2014b). Compostos químicos envolvidos na interação entre dois organismos são chamados genericamente de semioquímicos (MASON & PARKER, 2010; WYATT, 2014b). Interações químicas desempenham um importante papel em diferentes relações sociais de répteis (MASON & PARKER, 2010; MARTÍN & LÓPEZ, 2011), especialmente em lagartos e serpentes que apresentam o órgão vomeronasal bastante desenvolvido (COOPER JR., 1996).

As glândulas femorais e pré-anais são as principais fontes de semioquímicos em lagartos (ALBERTS, 1989). São glândulas holócrinas, que se conectam ao meio externo através de poros. A produção da secreção sofre influência de hormônios andrógenos, sendo mais intensa durante a estação reprodutiva, e a secreção é composta por lipídios e proteínas (informações detalhadas na INTRODUÇÃO GERAL). A composição de compostos lipofílicos das secreções femorais já foi descrita para algumas espécies de poucas famílias (ESCOBAR *et al.*, 2001; WELDON *et al.*, 2008; KHANNOONN *et al.*, 2011a; MARTÍN *et al.*, 2011; KHANNOONN, 2012; KHANNOONN *et al.*, 2013; BAECKENS *et al.*, 2017) e as informações acerca dos componentes proteicos são escassas (ALBERTS, 1990, 1991 e 1993; MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Diferentes trabalhos realizaram experimentos comportamentais e mostraram que as informações químicas contidas nas secreções femorais podem ser utilizadas na escolha de parceiros, para acessar a habilidade de luta e *status* de dominância entre machos e para determinar o sexo, idade e condição de saúde do emissor (informações detalhadas na INTRODUÇÃO GERAL).

Independente do contexto no qual a informação química está sendo utilizada, os sinais químicos precisam ser eficientes em termos de transmissão e detectabilidade (WYATT, 2014b) e há três principais mecanismos envolvidos na promoção de alterações na composição da secreção femoral em Squamata: (1) dieta, (2) fatores

ambientais e (3) genética. Alguns compostos frequentemente identificados nas secreções femorais de diferentes espécies de lagartos têm origem direta na dieta. Restrições alimentares podem aumentar o custo de um composto presente nas secreções, porém em determinados casos tais compostos podem funcionar como sinais sexuais honestos (GARCÍA-ROA *et al.*, 2017). A suplementação de vitamina D na dieta de machos de *Iberolacerta monticola* (Lacertidae) aumenta a porcentagem do composto na secreção, assim como o interesse das fêmeas (MARTÍN & LÓPEZ, 2006a). O mesmo ocorre com machos de *Lacerta screiberi* (Lacertidae) que recebem suplementação de vitamina E e há uma relação significativa entre a quantidade de vitamina e a qualidade da resposta imune do emissor (KOPENA *et al.*, 2014).

A temperatura e a umidade são dois fatores ambientais que podem influenciar a persistência das informações químicas no meio, locais com temperatura elevada podem aumentar a taxa de evaporação dos compostos químicos presentes nas secreções (ALBERTS, 1992). Em *I. cyreni* foi demonstrada uma relação inversamente proporcional entre aumento da temperatura e número de dardejadas direcionadas a papéis marcados com secreção femoral (MARTÍN & LÓPEZ, 2013). *Iberolacerta cyreni* é uma espécie que habita locais de temperaturas mais baixas e o aumento artificial da temperatura reduz a eficácia dos sinais químicos presentes na secreção da espécie. Foram encontradas diferenças significativas na composição de compostos lipofílicos de duas populações de *Podarcis hispanicus* (Lacertidae) que habitam localidades com diferenças de temperatura e umidade e o efeito negativo do aumento de temperatura no número de dardejadas foi mais intenso entre os indivíduos provenientes da população que habita local com temperatura mais baixa e maior umidade (MARTÍN *et al.*, 2015a). Em um extenso trabalho realizado com espécies de Lacertidae foi encontrada uma forte correlação entre a composição das secreções e as condições climáticas de temperatura e umidade (BAECKENS *et al.*, 2017): espécies que habitam ambientes xéricos tendem a ter maiores concentrações de ésteres de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa e as espécies que habitam ambientes méxicos apresentam maiores proporções de álcoois de cadeia curta e aldeídos.

Os sinais químicos e as estruturas responsáveis por sua detecção têm base genética e estão sob ação da seleção natural e/ou sexual (SYMONDS & ELGAR, 2008) e em muitos animais desempenham um importante papel no reconhecimento específico e no processo de especiação (WYATT, 2014b). Entre as espécies de lagartos estudadas

até o momento, não há duas que apresentem composição química idêntica e há evidências de que a secreção femoral é utilizada no reconhecimento específico. Em um experimento comportamental realizado com machos de três espécies de *Liolaemus* (*L. belli*, *L. fitzgeraldi* e *L. lemniscatus*) (Liolaemidae) foi possível observar que os indivíduos aumentam de forma significativa o número de dardejadas direcionadas a secreção de coespecíficos quando comparado com o número de dardejadas direcionadas a secreção de indivíduos das outras duas espécies (LABRA, 2011). A composição de compostos lipídicos permite a distinção entre as espécies de *P. atrata* e *P. liolepis* e as diferenças interespecíficas foram maiores do que as observadas entre cinco populações de *P. liolepis* (GABIROT *et al.*, 2010). Alterações na composição de sinais químicos não estão relacionadas com alterações na morfologia externa dos indivíduos (WYATT, 2014b) e recentemente têm sido utilizadas para avaliar complexos crípticos e explicar isolamento reprodutivo entre linhagens. Em *Heteronotia binoei* (Gekkonidae) as diferenças químicas separam com mais clareza as 10 linhagens reconhecidas por dados moleculares do que os dados morfológicos e os autores apontam a composição química da secreção como uma ferramenta chave para uma melhor compreensão da evolução de complexos crípticos em lagartos (ZOZAYA *et al.*, 2019).

Ameivula (HARVEY *et al.*, 2012) é um gênero de Teiidae que apresenta taxonomia complexa e passou por diversas alterações nos últimos anos. HARVEY e colaboradores (2012) criam o gênero *Ameivula* para agrupar as espécies do complexo *Cnemidophorus ocellifer*, no qual é possível identificar dois grupos morfológicos distintos (ARIAS *et al.*, 2011): (1) *A. littoralis* e (2) *A. ocellifera*. Recentemente, GOICOECHEA e colaboradores (2016) em um amplo trabalho molecular com as espécies de Gymnophthalmidae e Teiidae criam o gênero *Glaucmastix* para agrupar as espécies do grupo *A. littoralis*. Atualmente o gênero *Ameivula* compreende 11 espécies (UETZ & HOSEK, 2019) de lagartos terrestres que ocupam áreas abertas com diversos tipos de solos e elevadas temperaturas na América do Sul (ARIAS *et al.*, 2014a). Nove espécies descritas de *Ameivula* ocorrem no Brasil (UETZ & HOSEK, 2019) e são elementos conspicuos, principalmente, da herpetofauna do Cerrado e da Caatinga: *A. cipoensis* (ARIAS *et al.*, 2014b), *A. confusioniba* (ARIAS *et al.*, 2011), *A. jalapensis* (COLLI *et al.*, 2009), *A. mumbuca* (COLLI *et al.*, 2003), *A. nativo* (ROCHA *et al.*, 1997), *A. nigrigula* (ARIAS *et al.*, 2011), *A. ocellifera* (SPIX, 1825), *A. pyrrhogularis* (SILVA & ÁVILA-PIRES, 2013), e *A. xacriaba* (ARIAS *et al.*, 2014a).

Discussões sobre as relações filogenéticas entre as espécies de *Ameivula* ainda estão em aberto, dados moleculares apresentados por OLIVEIRA e colaboradores (2015) indicaram baixa diversidade genética entre as espécies de *Ameivula* da Caatinga e consideraram *A. pyrrhogularis* como sinônimo de *A. ocellifera*, porém um novo trabalho, com base em dados morfológicos e moleculares reconhece o monofiletismo de cada uma das espécies previamente conhecidas para a Caatinga (ARIAS *et al.*, 2017).

As espécies de *Ameivula* são relativamente pequenas (alcançando cerca de 8,5 cm de comprimento rostro-cloacal) (HARVEY *et al.*, 2012) e fêmeas e machos apresentam baixo número de poros femorais totais (menos de 20) (ARIAS *et al.*, 2011). *Ameivula* apresenta uma espécie partenogenética (*A. nativo*) (ROCHA *et al.*, 1997) e um potencial complexo híbrido (ARIAS e RECODER, em comunicação pessoal) revelado por incongruências entre as relações filogenéticas recuperadas por dados genéticos nucleares e mitocondriais. Esse potencial complexo híbrido envolve três espécies encontradas em solos arenosos a oeste do Rio São Francisco; duas das quais ainda não foram formalmente descritas. A linhagem híbrida corresponderia aos *Ameivula* que ocorrem apenas nos campos de dunas de Alagoado no noroeste do estado da Bahia (*Ameivula sp. nov. 1*) (**Figura 1**). As duas linhagens parentais corresponderiam a *A. pyrrhogularis* que ocorre em localidades da Caatinga do estado do Piauí e ao *Ameivula* que ocorre no campo de dunas do Xique-Xique, ao sul do campo de dunas de Alagoado no estado da Bahia (*Ameivula sp. nov. 2*) (**Figura 1**). Além das evidências moleculares, as três espécies são morfológicamente distintas e apresentam distribuição restrita, não ocorrendo em simpatria. *Ameivula pyrrhogularis* apresenta entre 16 e 24 poros femorais, o comprimento rostro-cloacal máximo é de 7,75 cm para as fêmeas e 8,9 cm para os machos e o dimorfismo sexual em coloração é bem evidente com machos adultos apresentando a região gular vermelha/laranja, contrastando com o resto da região ventral que é creme (SILVA & ÁVILA-PIRES, 2013). Embora as outras duas espécies não tenham sido formalmente descritas, pelo número total de poros femorais as duas espécies (*Ameivula sp. nov. 1*: entre 15 e 22; *Ameivula sp. nov. 2*: entre 16 e 20) pertencem ao grupo *A. ocellifera* (ARIAS *et al.*, 2011). *Ameivula sp. nov. 1* aparenta ter maior tamanho corporal e machos adultos apresentam coloração bastante escura (uma mistura de marrom e cinza/preto) sem ocelos na lateral do tronco. *Ameivula sp. nov. 2* parece ter tamanho corporal similar ao de *A. pyrrhogularis* e apresenta coloração mais

clara que *Ameivula sp. nov. 1*, com ocelos azul claro na lateral do tronco e alguns machos apresentam a região gular escura.



Figura 1. Machos adultos de *Ameivula pyrrhogularis* (superior), *Ameivula sp. nov. 1* (meio) e *Ameivula sp. nov. 2* (inferior). Fotos: Mauro Teixeira Jr.

Há pouca informação sobre interações químicas em Teiidae. *Salvator merianae* é a única espécie da família para a qual se tem informações sobre a composição de compostos lipofílicos presentes na secreção de glândulas femorais de machos adultos (MARTÍN *et al.*, 2011) e *Aspidoscelis tigris* é a única para a qual se tem informações sobre a composição proteica das secreções (ALBERTS, 1991). Embora os dados sejam escassos para os Teiidae, há uma série de evidências do uso de informações químicas durante o comportamento de forrageio (BISSINGER & SIMON, 1979; YANOSKY *et al.*, 1993; COOPER JR. *et al.*, 2002) e há evidências de que machos de *Pholidoscelis exsul* reconhecem informações químicas presentes em derivados da pele (superfície do corpo, região cloacal e glândulas femorais) de fêmeas (BOFILL & LEWIS, 1999). Até onde temos conhecimento, não há informações referentes a caracterização química da secreção de glândulas femorais ou experimentos de reconhecimento químico realizados para as espécies de *Ameivula*. Em uma expedição ao campo, na região de Barra na Bahia, tivemos a oportunidade de fazer um rápido teste com indivíduos de *Ameivula*

sp. nov. 2 e observamos que os machos dardejavam mais para hastes flexíveis de algodão impregnadas com a secreção femoral de outro macho adulto do que para hastes flexíveis de algodão com água ou sem nada, indicando que as espécies do gênero são potencialmente capazes de detectar informações químicas presentes nas secreções de glândulas femorais.

Considerando que a secreção femoral é utilizada por diferentes espécies de lagartos no reconhecimento específico, pode estar envolvida no isolamento reprodutivo e funcionar como importante ferramenta na identificação de diferentes linhagens genéticas e complexos crípticos de espécies, conhecer a composição química de *Ameivula sp.nov. 1*, *Ameivula sp. nov. 2* e *A. pyrrhogularis* pode contribuir para melhor compreensão das relações evolutivas dessas três espécies e reunir novas evidências para avaliar a potencial condição híbrida de *Ameivula sp. nov. 1*. Com base no exposto, o presente capítulo tem como principais objetivos: (1) caracterizar quimicamente a secreção femoral de machos adultos das três espécies, (2) comparar a composição química das três espécies para avaliar se há diferenças significativas entre elas, que permitam distingui-las e (3) testar o comportamento de indivíduos das três espécies quando expostos à secreção femoral de cada uma delas.

Materiais e Métodos

Área de estudo

As três localidades nas quais foram obtidas amostras (Campos de dunas de Alagoado, Campos de dunas de Xique-Xique e Parque Nacional da Serra da Capivara) localizam-se dentro do domínio morfoclimático da Caatinga. A Caatinga é conhecida por ser um domínio morfoclimático semi-árido com temperatura elevada, precipitação anual baixa e regime de chuvas irregular (NIMER, 1989). Com base em dados disponíveis no banco de dados do “*WorldClim – Global Climate Data*” (Disponível em: <https://www.worldclim.org>) (HIJMANS *et al.*, 2005) a variação anual de temperatura e precipitação nas três localidades é bastante parecida, embora o P.N. da Serra da Capivara apresente maiores valores para precipitação (**Figura 2**).

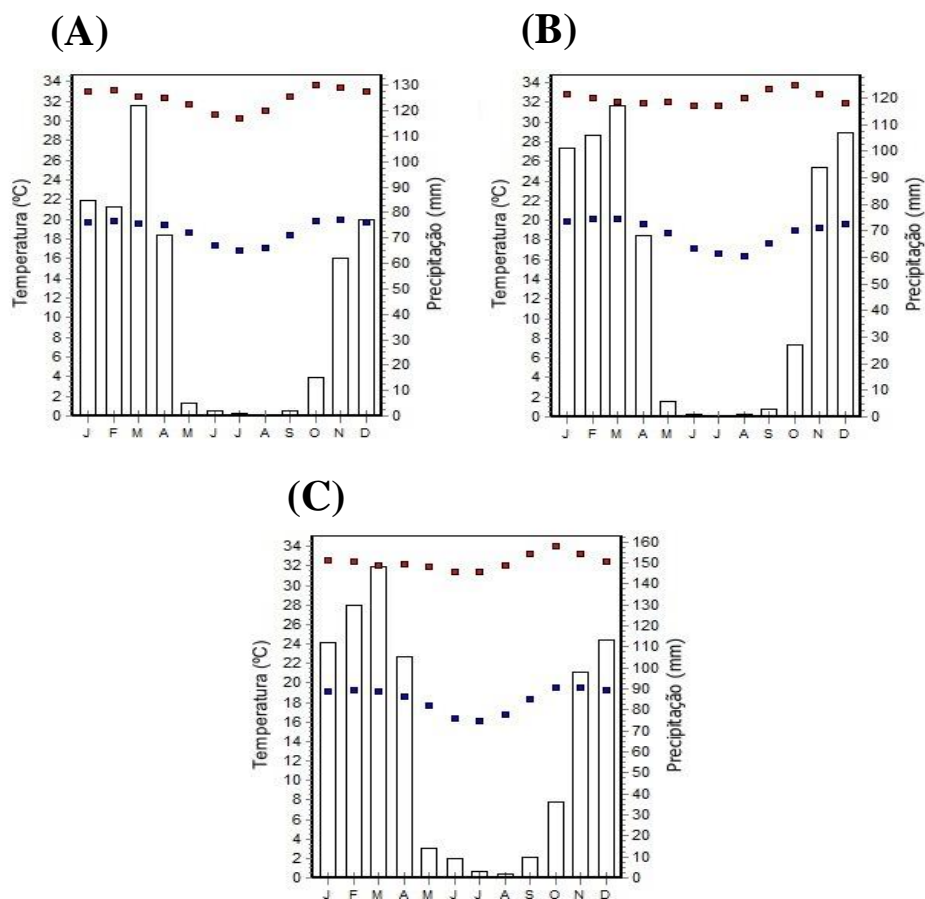


Figura 2. Média mensal da temperatura (°C) e da precipitação (mm) ao longo de um ano nas três localidades da Caatinga nas quais foram obtidas as amostras das três espécies de *Ameivula*. **(A)** Campo de Dunas de Alagoado (Município de Casa Nova, BA). **(B)** Campos de Dunas de Xique-Xique (Município de Barra, BA). **(C)** Parque Nacional da Serra da Capivara (Município de Coronel José Dias, PI).

Comparação interespecífica: tamanho corporal e número de poros femorais

Para verificar se há variação no número total de poros femorais (POR) e no comprimento rostro-cloacal (CRC) entre os machos das três espécies foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey (ZAR, 2010). Para as três espécies os dados (POR e CRC) apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk: $p > 0,09$) e homogeneidade de variâncias (Levene: $p > 0,6$). Para esta comparação foram utilizados apenas os machos que foram coletados pelo Laboratório de Herpetologia do IB-USP e a contagem dos poros femorais foi realizada sob a lupa devido ao pequeno tamanho da estrutura nas espécies.

Composição e análise química da secreção femoral

Para analisar a composição química da secreção femoral de fêmeas adultas foram utilizadas cinco amostras de *Ameivula pyrrhogularis* do P. N. da Serra da Capivara no município de Coronel José Dias, PI e quatro de *Ameivula sp. nov. 2* do município de Barra, BA. No caso dos machos foram obtidas 16 amostras de *A. pyrrhogularis*, todos do P. N. da Serra da Capivara no município de Coronel José Dias, PI (12 de março de 2017 e quatro de março de 2019), 23 amostras de *Ameivula sp. nov. 2* do município de Barra, BA (sete de novembro de 2018 e 16 são de março de 2019) e 26 de *Ameivula sp. nov. 1* (11 de março de 2017 e 15 de março de 2019) do povoado de Alagoado, no município de Casa Nova, BA. O número de campo (MTR) de cada amostra obtida encontra-se nas tabelas apresentadas nos resultados. Licença de coleta para o P.N. Serra da Capivara SISBIO 54599-3 e para as demais localidades SISBIO 30309-8.

A extração da secreção, sua preparação e a realização da cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS) seguiram o exposto na METODOLOGIA GERAL. Após a realização da CG-MS, as sobras das amostras dissolvidas em solvente foram transferidas para microtubos de 500 µL e o solvente foi removido por centrifugação a vácuo (*Speed-Vac Savant*). O material obtido seguiu a metodologia de extração de proteínas com acetonitrila 80% ácido trifluoracético 0,05% apresentada na METODOLOGIA GERAL.

Análise estatística

Foram realizadas comparações da composição química em três níveis: (1) comparações intraespecíficas para avaliar potenciais diferenças entre as amostras coletadas em diferentes viagens de campo, (2) quando detectado mais de um padrão químico dentro de uma mesma espécie, foram realizadas comparações intraespecíficas para avaliar potenciais diferenças entre indivíduos de diferentes padrões e (3) comparações interespecíficas, separadas para os diferentes padrões químicos identificados, para verificar as potenciais diferenças estatísticas entre as secreções das três espécies. Todas as comparações receberam o mesmo tratamento. Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa sobre presença/ausência de compostos em cada grupo

analisado, seguida pelas análises estatísticas apresentadas na METODOLOGIA GERAL.

Experimento de reconhecimento químico

Amostragem e manutenção

Foram obtidos 15 machos e cinco fêmeas de *Ameivula sp. nov. 1* no povoado de Alagoado no município de Casa Nova, Bahia, 17 machos e 16 fêmeas de *Ameivula sp. nov. 2* na localidade de Pé da Serra no município de Barra, Bahia e cinco machos e 11 fêmeas de *A. pyrrhogularis* no município de Coronel José Dias, Piauí. Todos eram adultos e foram coletados manualmente evitando qualquer dano físico aos mesmos. Os indivíduos foram sexados através da inspeção da região cloacal (**Figura 3**). Machos apresentam cloacas triangulares e observam-se os hemipênis massageando a porção mais proximal da cauda e as fêmeas apresentam cloaca circular. Sabemos que o experimento foi realizado durante a estação reprodutiva, pois foi possível observar esperma em todos os machos que tiveram suas cloacas inspecionadas e, embora não tenham sido utilizadas no experimento, foram observadas fêmeas com ovos.



Figura 3. Imagem da região cloacal de dois indivíduos adultos de *Ameivula sp. nov. 1*, no macho (esquerda) é possível observar o formato triangular da cloaca e os dois hemipênis evertidos e na fêmea (direita) se nota o formato circular da cloaca e a ausência de sulcos laterais que marcam a posição dos hemipênis nos machos.

Para os machos foi medido o comprimento rostro-cloacal (CRC) e realizada a remoção da secreção femoral seguindo a METODOLOGIA GERAL. A secreção obtida da perna esquerda foi armazenada individualmente em microtubos de vidro para futuras análises de sua composição química, ao passo que a da perna direita foi armazenada em um outro microtubo formando um *pool* de secreção de diferentes indivíduos para o

experimento comportamental. Sabe-se que a composição química das secreções apresenta variação individual refletindo condições do emissor (ALBERTS, 1993; MARTÍN & LÓPEZ, 2006a), dessa forma a utilização do *pool* de secreção para o experimento químico busca minimizar os efeitos de características individuais nas respostas obtidas (NISA *et al.*, 2019). Para as fêmeas foi medido o comprimento rostro-cloacal (CRC), porém não foi possível realizar a remoção da secreção. As secreções dos machos permaneceram no freezer – 20°C até a realização do experimento.

Após a sexagem, os indivíduos foram transferidos para terrários individuais (40 x 40 cm) contendo areia proveniente de sua própria localidade como substrato. Os terrários permaneceram em ambiente externo com condições naturais de temperatura, luminosidade e umidade. Os lagartos foram alimentados diariamente com pequenos grilos, encontrados nas áreas de cultivo dos moradores de cada uma das localidades e possuíam água *ad libitum*. Os indivíduos passaram seis dias nos terrários e após a finalização do experimento encontravam-se em perfeitas condições de saúde e foram liberados em seus respectivos locais de coleta. O experimento foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Biociências da USP (n° da proposta 345/2019) e autorizada pelo SISBIO (30309-12).

Desenho experimental

Para testar a habilidade de machos e fêmeas de cada uma das espécies em discriminar machos coespecíficos com base apenas na secreção femoral, foram comparados o número de dardejadas e o tempo de latência para a primeira dardejada (LAT) (COOPER & BURGHARDT, 1990; COOPER, 1994) quando apresentados ao estímulo químico de secreção femoral de machos de cada uma das espécies impregnados em uma haste flexível com ponta de algodão (*swab*). Essa metodologia é a mesma utilizada para diferentes espécies em trabalhos publicados sobre o tema para os quais o aumento do número de dardejadas tem sido utilizado como indicativo de reconhecimento ou aumento de interesse por um dado estímulo químico (COOPER & BURGHARDT, 1990; ALBERTS, 1993; COOPER, 1994; MARTÍN & LÓPEZ, 2006a).

O experimento foi realizado em março de 2019 e, embora não existam dados na literatura que confirmem ser esta a estação reprodutiva das espécies, todos os machos sexados apresentaram esperma em sua cloaca, indicando que estavam sexualmente

ativos. Após a transferência dos indivíduos para seus respectivos terrários, aguardamos um período de 48 horas para dar início aos testes comportamentais, permitindo assim que os indivíduos estivessem habituados ao seu ambiente. O *pool* de secreção de cada espécie foi triturado para homogeneização das amostras e antes de dar início a cada teste, um *swab* limpo era introduzido no microtubo para impregnação dos odores. Para garantir que a mesma quantidade aproximada de secreção fosse utilizada em cada teste, após impregnar com as secreções, os *swabs* eram friccionados contra a parede do microtubo até que não fosse possível observar pedaços de plugues femorais no mesmo. *Swabs* impregnados com água destilada foram utilizados como controle não-odorífero.

Cada indivíduo foi testado apenas uma vez por dia e a ordem dos estímulos (secreção femoral de machos de *Ameivula sp. nov. 1*, *Ameivula sp. nov. 2*, *A. pyrrhogularis* e controle) foi apresentada de forma randômica. Os testes foram realizados entre 13h e 15h enquanto os animais se mostravam ativos. Para cada teste, o mesmo experimentador se aproximou vagarosamente do terrário, buscando não se tornar visível ao indivíduo, e moveu a extremidade do *swab* para uma posição a 1 cm do focinho do indivíduo (**Figura 4**). Foram registrados o tempo de latência para a primeira dardejada (LAT), o número de dardejadas direcionadas ao *swab* (DIR) e ao ar (AR) durante 60 segundos após a primeira dardejada. Caso o indivíduo não dardejasse em 60 segundos, o experimento era finalizado. Também foram anotadas possíveis alterações comportamentais durante o experimento como, por exemplo, ataques ao *swab*.



Figura 4. Simulação da apresentação de um estímulo químico impregnado no *swab* a um macho adulto de *Ameivula sp. nov. 1*. Foto: Miguel Rodrigues.

Análise estatística

Previamente as análises, os dados foram transformados no logaritmo decimal do valor observado + 1, permitindo assim incluir nas análises os valores de dardejadas iguais a zero. Mesmo após a transformação, algumas variáveis não apresentaram distribuição normal e/ou variâncias homogêneas e as comparações foram feitas com testes não paramétricos (ZAR, 2010). Para testar se os indivíduos responderam diferentemente para cada um dos tratamentos foi realizado o teste de Friedman separadamente para cada uma das variáveis medidas (tempo de latência, número de dardejadas para o ar, número de dardejadas para o *swab* e o número total de dardejadas) (FIELD, 2009). Quando detectadas diferenças pelo teste de Friedman ($p < 0,05$), foram realizados testes de Wilcoxon par a par para identificar quais tratamentos diferem entre si (FIELD, 2009). Para a interpretação do teste de Wilcoxon foi realizada a correção de Bonferroni, dividindo o valor de α pelo número de comparações realizadas (FIELD, 2009). Como foram realizadas quatro comparações (quatro tratamentos), foram considerados significativos valores de α inferiores a 0,012. Para avaliar se há diferenças entre machos e fêmeas da mesma espécie dentro de um mesmo tratamento (secreção de machos de *Ameivula sp. nov. 1*, de *Ameivula sp. nov. 2* e de *A. pyrrhogularis* e água destilada) foi realizado o teste de Mann-Whitney (ZAR, 2010).

Resultados

Tamanho corporal e número de poros femorais

O CRC apresentou diferenças significativas entre as espécies (ANOVA: $F_{2,43} = 23,87, p = 0,001$). Machos de *Ameivula sp. nov. 1* apresentaram maior tamanho corporal (N = 20; Média \pm Desvio Padrão: $99,02 \pm 8,51$ mm) do que os machos de *A. pyrrhogularis* (N = 17; Média \pm Desvio Padrão: $83,03 \pm 8,74$ mm) e de *Ameivula sp. nov. 2* (N = 9; Média \pm Desvio Padrão: $78,88 \pm 8,52$ mm) (Teste de Tukey: $p < 0,01$) (**Figura 5**). Não foi observada diferença significativa no CRC dos machos de *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2* (Teste de Tukey: $p = 0,47$). Há diferenças estatísticas em relação ao número total de poros femorais das três espécies (ANOVA: $F_{2,43} = 19,16, p = 0,01$). *Ameivula pyrrhogularis* apresentou maior número de poros femorais (N = 17; Média \pm Desvio Padrão: $20,71 \pm 1,49$) do que *Ameivula sp. nov. 1* (N = 20; Média \pm Desvio Padrão: $17,85 \pm 1,81$) e *Ameivula sp. nov. 2* (N = 9; Média \pm

Desvio Padrão: $17 \pm 1,73$) (Teste de Tukey: $p < 0,01$) (**Figura 5**). Não foi observada diferença significativa em POR entre *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* (Teste de Tukey, $p = 0,42$).

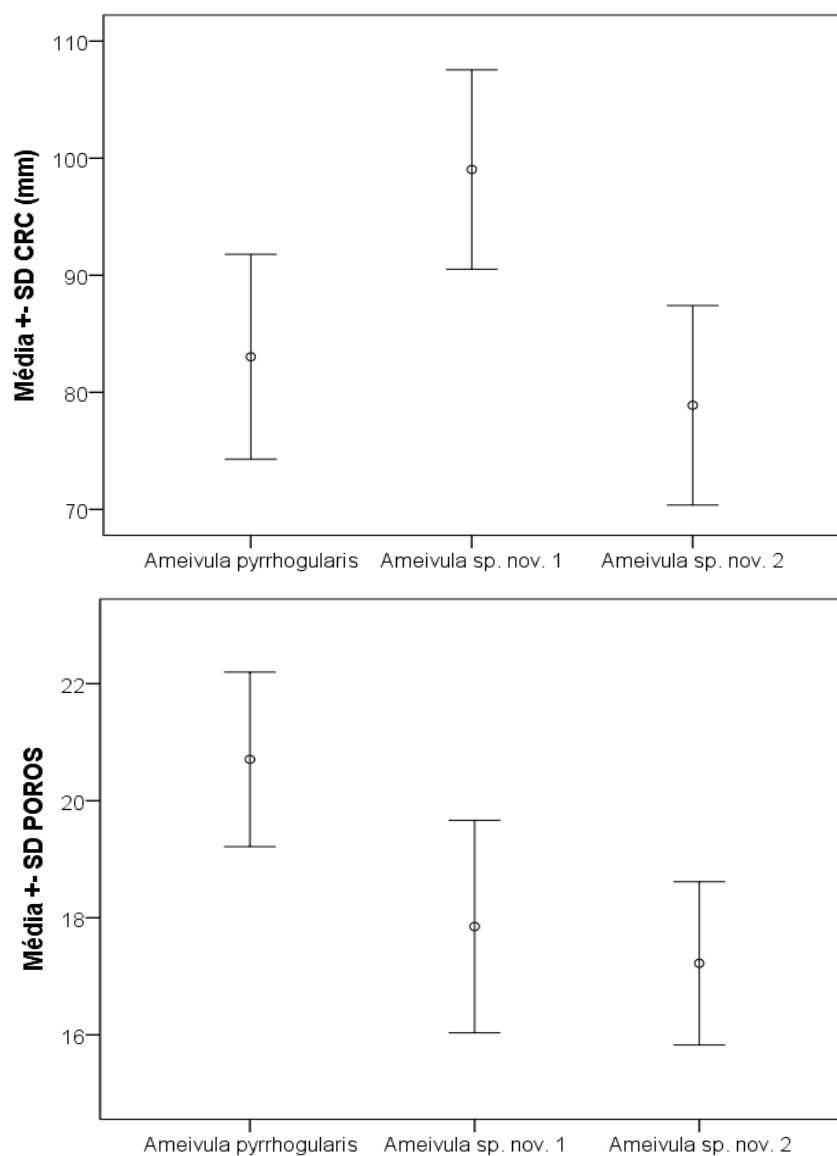


Figura 5. Média \pm desvio padrão (SD) do comprimento rostro-cloacal (CRC) e do número total de poros femorais em *Ameivula pyrrhogularis*, *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2*.

Reconhecimento químico

Machos de *Ameivula sp. nov. 1* não apresentaram diferenças entre tratamentos no número de dardejadas direcionadas ao ar (Friedman: $\chi^2 = 2,22$ e $p = 0,5$), mas

apresentaram diferenças no tempo de latência (Friedman: $\chi^2 = 8,37$ e $p = 0,03$) e no número de dardejadas direcionadas ao *swab* (Friedman: $\chi^2 = 22,93$ e $p = 0,001$) (**Tabela 1**). O tempo de latência para a secreção de *Ameivula sp. nov. 2* foi menor do que para o controle (Wilcoxon: $p = 0,002$). Machos de *Ameivula sp. nov. 1* deram mais dardejadas para a secreção da sua própria espécie do que para a secreção de *Ameivula sp. nov. 2* (Wilcoxon: $p = 0,001$) e *A. pyrrhogularis* (Wilcoxon: $p = 0,005$). O número de dardejadas que esses machos direcionaram para o controle foi menor do que as direcionadas para a secreção de sua própria espécie (Wilcoxon: $p = 0,001$) e *Ameivula sp. nov. 2* (Wilcoxon: $p = 0,008$). Fêmeas de *Ameivula sp. nov. 1* não apresentaram diferenças entre os quatro tratamentos em nenhuma das variáveis medidas (Friedman: $p > 0,09$).

Machos de *Ameivula sp. nov. 2* não apresentaram diferenças no tempo de latência (Friedman: $\chi^2 = 4,43$ e $p = 0,2$) e no número de dardejadas direcionadas ao ar (Friedman: $\chi^2 = 3,47$ e $p = 0,3$) entre os quatro tratamentos, mas apresentaram diferenças no número de dardejadas direcionadas ao *swab* (Friedman: $\chi^2 = 8,44$ e $p = 0,03$) (**Tabela 1**). O número de dardejadas direcionadas ao *swab* foi menor para o controle do que para *Ameivula sp. nov. 1* (Wilcoxon: $p = 0,004$). Fêmeas de *Ameivula sp. nov.* não apresentaram diferenças entre os quatro tratamentos em nenhuma das variáveis medidas (Friedman: $p > 0,1$). Nem fêmeas, nem machos de *A. pyrrhogularis* reagiram diferentemente aos quatro tratamentos (Friedman: $p > 0,1$).

Quando comparadas as três variáveis entre machos e fêmeas da mesma espécie e para um mesmo tratamento, não foram observadas diferenças em *A. pyrrhogularis* (Mann-Whitney: $U > 0,1$) e em *Ameivula sp. nov. 2* (Mann-Whitney: $U > 0,07$). Em *Ameivula sp. nov. 1*, machos apresentaram menor tempo de latência para secreção de *Ameivula sp. nov. 1* (Mann-Whitney: $U = 0,03$) e *Ameivula sp. nov. 2* (Mann-Whitney: $U = 0,04$). Apenas machos de *Ameivula sp. nov. 1* responderam de forma agressiva ($N = 5$), atacando o cotonete, quando apresentadas secreções femorais de machos das outras duas espécies, mas nunca para secreção da própria espécie.

Tabela 1. Média e desvio padrão (SD) do tempo de latência (LAT) em segundos, do número de dardejadas direcionadas ao *swab* (DIR) e do número de dardejadas direcionadas ao ar (DAR) para machos e fêmeas de cada uma das três espécies de *Ameivula*. Controle: água destilada.

			<i>Ameivula sp. nov. 1</i>		<i>Ameivula sp. nov. 2</i>		<i>Ameivula pyrrhogularis</i>		
			fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	
Tratamento	<i>Ameivula sp. nov. 1</i>	LAT	Média	6,80	1,87	9,57	2,75	12,90	24,80
			SD	9,12	3,40	21,40	4,33	24,85	32,14
		DIR	Média	17,00	20,53	8,64	12,69	5,50	7,40
			SD	9,41	14,17	8,36	7,27	5,02	10,88
		DAR	Média	4,60	2,33	2,29	1,56	2,10	0,60
			SD	4,39	3,09	2,23	1,82	3,14	1,34
	<i>Ameivula sp. nov. 2</i>	LAT	Média	13,80	1,00	5,21	8,56	7,70	2,00
			SD	25,86	1,20	15,82	20,13	18,42	3,94
		DIR	Média	6,00	11,33	12,50	10,75	5,70	8,20
			SD	5,15	7,15	10,44	9,33	3,56	2,68
		DAR	Média	1,60	2,80	1,43	1,13	1,50	1,00
			SD	1,82	3,90	1,99	3,48	1,18	1,41
	<i>Ameivula pyrrhogularis</i>	LAT	Média	13,00	16,93	5,29	7,13	7,50	13,20
			SD	26,28	26,95	15,80	17,94	18,59	26,19
		DIR	Média	10,40	10,87	10,79	9,63	9,40	7,40
			SD	26,28	10,81	7,69	5,44	6,69	8,32
		DAR	Média	0,60	3,20	3,00	1,50	2,30	0,20
			SD	0,89	3,82	4,44	2,39	3,06	0,45
Controle	LAT	Média	2,00	18,60	10,50	12,88	13,50	1,60	
		SD	2,92	26,17	21,08	23,45	24,55	0,55	
	DIR	Média	8,80	5,73	7,07	6,38	4,50	2,40	
		SD	5,63	5,85	6,41	5,44	4,09	0,89	
	DAR	Média	3,40	1,73	3,93	1,75	2,70	0,80	
		SD	3,29	3,03	5,41	2,44	4,52	1,30	

Composição lipídica da secreção femoral

As tabelas com os compostos lipofílicos identificados em cada uma das amostras de machos das três espécies de *Ameivula* são apresentadas no **Apêndice**.

Fêmeas

Na **Tabela 2** são apresentadas as informações de identificação, localidade de coleta, comprimento rostro-cloacal, número de poros femorais, estado reprodutivo e número de compostos lipídicos identificados em cada uma das amostras de fêmeas de *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2*. Todas as amostras apresentaram quantidades baixas de secreção (< 1,5 mg) e foram obtidas de fêmeas reprodutivas.

Tabela 2. Dados de identificação (MTR), localidade de coleta, comprimento rostro-cloacal em centímetros (CRC), número total de poros femorais, estado das gônadas e número total de compostos lipofílicos identificados nas amostras de fêmeas de *Ameivula pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2*.

	MTR	Localidade	CRC	Poros	Gônadas	compostos
<i>Ameivula pyrrhogularis</i>	39535	P.N. Serra da Capivara	6,69	20	desova recente	32
	39633	P.N. Serra da Capivara	8,26	19	Ovos	25
	39525	P.N. Serra da Capivara	6,99	21	Ovos	12
	39580	P.N. Serra da Capivara	7,56	19	Ovos	5
	39581	P.N. Serra da Capivara	7,59	18	folículos vitelogênicos	7
<i>Ameivula sp. nov. 2</i>	41601	Barra	7,2	17	Ovos	15
	41660	Barra	6,6	17	Ovos	11
	41676	Barra	7,8	18	Ovos	4
	41677	Barra	7,2	18	folículos vitelogênicos	7

As fêmeas de *Ameivula sp. nov. 2* somaram 17 compostos lipídicos (**Tabela 3**): um álcool, esqualeno, α -Tocoferol, duas cetonas, quatro ésteres de ácidos graxos e oito esteroides. Duas fêmeas apresentaram maior número de compostos e sua secreção foi formada, principalmente, por ésteres de ácidos graxos (TIC = 17,75% e 16,28%) e esteroides (TIC = 63,08% e 67,21%). As outras duas fêmeas apresentaram número muito baixo de compostos e os esteroides representaram 77,34% e 88,36% das secreções. Todas as fêmeas apresentaram quantidades significativas de hexanol (TIC entre 6,03% e 11,91%), esqualeno (TIC entre 5,61% e 10,78%) e colesterol (TIC entre 37,66% e 69,38%). Nas fêmeas de *A. pyrrhogularis* foram identificados 40 compostos (**Tabela 4**): esqualeno, α -Tocoferol, três amidas, quatro álcoois, cinco aldeídos, seis ésteres de ácidos graxos e 20 esteroides. Duas fêmeas apresentaram maior número de compostos e significativas quantidades de colesterol (TIC = 35,52% e 32,78%), cholesta-3,5-dien-7-one (TIC = 15,7% e 21,36%), campesterol (TIC = 5,77% e 4,91%), cholest-4-en-3-one (TIC = 6,62% e 4,38%) e cholesta-4,6-dien-3-one (TIC = 6,51% e

9,98%) e três fêmeas apresentaram número muito baixo de compostos e grandes quantidades de esqualeno (TIC > 22%).

Tabela 3. Compostos lipofílicos identificados em quatro amostras de secreções de fêmeas adultas de *Ameivula sp. nov.* 2. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) em cada indivíduo. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. As identificações correspondem ao MTR de cada amostra.

TR	Compostos	TIC (%)			
		41601	41660	41676	41677
4.1	Hexanol	6,24	7,48	11,91	6,03
29.3	Tridecanona	0,86	-	-	-
33.3	Pentadecanona	1,42	-	-	-
34.0	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	3,17	2,59	-	-
35.4	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	6,35	7,45	-	-
38.0	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	3,74	2,84	-	-
39.2	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	4,49	3,4	-	-
49.4	Esqualeno	8,32	9,03	10,75	5,61
50.1	Derivado do Cholesta-2,4-diene	1,2	1,55	-	-
50.3	Cholesta-4,6-dien-3-ol	2,83	-	7,96	2,42
50.6	Cholesta-3,5-diene	4,1	2,84	-	3,82
53.6	Esteróide não identificado (155, 197, 251, 377, 392)	2,27	-	-	-
53.7	Colesterol	45,24	46,51	69,38	37,66
53.9	α -Tocoferol	2,33	-	-	-
54.4	Ergosta-7,22-dien-3-ol	-	3,08	-	-
54.5	Campesterol	7,44	13,23	-	28,18
55.1	Ergosterol	-	-	-	16,28

Tabela 4. Compostos lipofílicos identificados em cinco amostras de secreções de fêmeas adultas de *Ameivula pyrrhogularis*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) em cada indivíduo. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. As identificações correspondem ao MTR de cada amostra.

TR	Compostos	TIC (%)				
		39535	39633	39525	39580	39581
4.1	Hexanol	-	-	1,4	3,35	5,42
-	Hexadecanol	-	-	0,92	-	-
31.0	Hexadecanal	0,22	-	-	-	-
34.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	-	0,16	4,17	-	-

34.6	9-Octadecenal	0,41	-	-	-	-
35.0	Octadecanal	0,29	-	1,43	-	-
36.4	Octadecanol	0,03	0,12	-	-	-
37.2	Pentadecanamida	-	0,42	-	-	-
-	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	0,96	-	-
37.6	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,23	0,56	-	-	-
37.7	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,22	0,71	-	-	-
37.9	Hexadecanamida	-	0,27	-	-	-
38.0	Aldeído não identificado	0,07	-	-	-	-
38.2	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	0,14	0,32	1,13	1,9	3,84
38.7	Eicosanal	0,08	-	-	-	-
39.9	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	-	0,17	-	-	-
40.1	Eicosanol	0,13	-	-	-	-
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	1,23	0,48	-	-	-
47.3	13-Docosenamida	0,33	0,33	-	-	-
48.0	Esqualeno	0,43	0,13	72,67	77,1	22,32
48.1	Cholesta-2,4-diene	0,18	-	-	-	-
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	1,87	0,62	1,41	-	4,73
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	1,65	1,29	1,58	-	5,34
49.0	Cholesta-3,5-diene	5,61	2,79	4,4	10,68	16,32
50.4	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0,98	-	-	-	-
50.7	Esteróide não identificado (155, 197, 251, 363, 378)	1,39	3,02	-	-	-
51.6	Esteróide não identificado (155, 197, 251, 377, 392)	1,35	0,59	-	-	-
51.9	Colesterol	35,52	32,78	7,89	-	42,03
52.1	α -Tocoferol	-	2,45	-	6,97	-
52.4	Desmosterol	0,82	-	-	-	-
52.5	Ergosterol	1,47	3,07	-	-	-
53.0	Cholesta-3,5-dien-7-one	15,7	21,36	-	-	-
53.2	Campesterol	5,77	4,91	-	-	-
53.5	Cholest-4-en-3-one	6,62	4,38	-	-	-
53.7	Stigmasterol	1,17	4,85	-	-	-
53.8	Ergosta-5,8-dien-3-ol	2,92	-	-	-	-
53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	6,51	9,98	-	-	-
54.2	Stigmasta-4,6,22-trien-3-ol	4,33	4,24	-	-	-
55.1	γ -Sitosterol	2,05	-	2,04	-	-
55.2	Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	0,28	-	-	-	-

Machos de *Ameivula pyrrhogularis*

Um macho de *A. pyrrhogularis* (MTR39534) não apresentou bons resultados de CG-MS e por isso não foi incluído nas demais comparações. Na **Tabela 5** são apresentadas as informações de ano de coleta, identificação, comprimento rostro-

cloacal, número de poros femorais totais, estado das gônadas e número de compostos lipídicos identificados em cada uma das 15 amostras de machos de *A. pyrrhogularis* que apresentaram bons resultados.

Tabela 5. Dados de ano de coleta, identificação (MTR), comprimento rostro-cloacal em centímetros (CRC), número total de poros femorais, estado das gônadas e número total de compostos lipofílicos identificados nas amostras de machos adultos de *Ameivula pyrrhogularis*.

Ano	MTR	CRC	poros	Gônadas	compostos
2017	39582	6,9	21	opacos e enovelados	37
	39635	7,13	19	opacos e enovelados	28
	39626	7,32	19	opacos e enovelados	34
	39634	7,37	20	opacos e enovelados	34
	39644	7,49	22	opacos e enovelados	37
	39579	7,53	22	opacos e enovelados	31
	39625	8,48	20	opacos e enovelados	39
	39528	8,88	21	opacos e enovelados	21
	39646	9,07	19	opacos e enovelados	40
	39624	9,21	22	opacos e enovelados	41
	39645	9,33	20	opacos e enovelados	24
2019	-	8,1	-	esperma na cloaca	41
	-	9	-	esperma na cloaca	39
	-	10	-	esperma na cloaca	33
	-	10,1	-	esperma na cloaca	43

No total foram identificados 72 compostos lipídicos em machos de *A. pyrrhogularis*: o α -Tocoferol, o esqualeno, quatro álcoois, quatro cetonas, quatro amidas, 10 aldeídos, 10 ácidos graxos, 12 ésteres de ácidos graxos e 26 esteroides (**Tabela 6**). O número de compostos identificados por indivíduo variou entre 24 e 43, mas apenas três indivíduos apresentaram menos de 30 compostos lipofílicos. A composição das secreções de machos de *A. pyrrhogularis* pode claramente ser dividida em dois padrões: **padrão 1** – com maior porcentagem de esteroides e **padrão 2** – com significativa porcentagem de ácidos graxos. Todas as amostras de março de 2019 se enquadraram no **padrão 2**, quatro amostras de março de 2017 também se enquadraram neste padrão, enquanto as outras sete representaram o **padrão 1**.

Tabela 6. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreções femorais de machos adultos de *Ameivula pyrrhogularis* do Parque Nacional da Serra da Capivara, Piauí. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a média e o desvio padrão (SD) de sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) para os dois padrões químicos identificados na espécie. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	TIC (%)			
		padrão 1		padrão 2	
		Média	SD	Média	SD
4.0	Hexanal	-	-	0,07	0,13
4.2	Hexanol	-	-	0,35	0,43
12.4	2-Nonenal	0,02	0,04	-	-
15.8	4-Decenal	0,03	0,04	0,01	0,01
24.9	4-Dodecanona	-	-	0,02	0,05
25.2	Dodecanal	0,05	0,12	-	-
26.1	Dodecanol	0,01	0,04	0,02	0,05
26.9	Ácido Tridecanóico	0,21	0,38	-	-
28.8	Pentadecanal	0,11	0,19	-	-
30.6	Ácido Tetradecanóico	-	-	0,56	0,53
31.8	Hexadecanal	0,32	0,17	0,35	0,24
32.2	Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	0,07	0,12	-	-
32.8	Ácido Pentadecanóico	-	-	0,15	0,22
33.2	Hexadecanol	-	-	0,10	0,12
33.8	2-Heptadecanona	0,07	0,18	0,25	0,49
34.1	Heptadecanal	0,14	0,14	-	-
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,17	0,18	0,17	0,20
34.5	Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	0,39	0,56
35.0	Ácido Hexadecanóico	0,45	1,19	13,90	10,25
35.1	Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	0,03	0,04	-	-
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	2,06	0,23	1,01	1,32
35.6	9-Octadecenal	0,05	0,09	0,27	0,36
36.1	Octadecanal	1,52	0,56	0,51	0,58
36.9	Ácido Heptadecanóico	-	-	0,18	0,18
37.5	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,35	0,38	0,05	0,08
37.6	Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,25	0,20	0,14	0,22
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,26	0,44	0,05	0,08
38.3	Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,02	0,05	2,83	2,66
38.4	Ácido 9-Octadecenóico	0,07	0,19	7,45	5,91
38.5	Ácido graxo não identificado	-	-	0,49	1,02
38.9	Ácido Octadecanóico	-	-	5,94	4,75
39.1	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	1,42	0,25	0,56	1,04
39.2	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	1,97	0,29	0,53	1,11
39.4	Hexadecanamida	0,16	0,30	1,24	1,77
39.5	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	1,20	0,30	0,56	0,43
40.4	2-Pentacosanona	0,01	0,02	-	-

40.7	Eicosanal	0,11	0,09	-	-
41.3	Eicosanol	-	-	0,03	0,06
41.4	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,57	0,84	0,20	0,39
41.5	Cetona não identificada	0,01	0,02	-	-
41.6	9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	0,47	0,49	0,02	0,07
42.9	Octadecanamida	0,24	0,64	0,56	1,20
46.3	Nonadecanamida	-	-	0,32	0,82
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,89	0,39	0,18	0,33
49.1	13-Docosenamida	5,25	6,20	1,43	1,00
49.6	Esqualeno	1,73	1,71	1,47	1,02
50.2	Cholesta-2,4-diene	0,11	0,11	0,01	0,04
50.3	Derivado do Cholesta-2,4-diene	1,25	0,68	0,46	0,38
50.5	Cholesta-4,6-dien-3-ol	1,27	0,54	0,97	0,55
50.8	Cholesta-3,5-diene	3,54	1,63	1,94	1,02
52.3	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0,98	0,62	0,36	0,41
52.6	Anthiaergosta-5,7,9,14-tetraene	2,26	0,53	1,16	0,73
53.8	Esteróide não identificado (155, 197, 251, 377, 392)	1,74	0,77	0,99	0,72
53.9	Colesterol	17,10	4,23	15,03	7,63
54.1	α -Tocoferol	3,38	1,02	1,09	1,46
54.6	Desmosterol	-	-	1,81	2,27
55.2	Ergosterol	0,36	0,64	1,53	2,45
55.3	Cholesta-3,5-dien-7-one	24,42	9,04	11,69	13,23
55.4	Ergosta-7,22-dien-3-ol	0,14	0,38	-	-
55.6	Campesterol	3,32	1,16	1,99	1,50
56.0	Cholest-4-en-3-one	3,40	1,41	0,59	0,48
56.1	Stigmasterol	1,05	0,90	0,17	0,32
56.4	Ergosta-5,8-dien-3-ol	0,18	0,47	2,83	2,89
56.5	Cholesta-4,6-dien-3-one	6,73	1,06	3,21	2,24
56.8	Stigmasta-4,6,22-trien-3-ol	5,72	2,16	5,39	4,44
57.2	γ -Sitosterol	0,03	0,09	0,28	0,51
57.8	Lanosterol	0,23	0,40	-	-
58.0	4-Campestene-3-one	0,99	1,45	-	-
58.1	Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	0,44	0,88	3,45	2,79
58.4	Derivado do γ -Sitosterol	0,06	0,15	0,34	0,39
58.8	Derivado do Stigmasterol	0,66	0,80	-	-
59.5	Derivado do Cholest-7-en-3-ol	0,50	0,78	2,38	2,56

Sete compostos foram identificados apenas nos indivíduos coletados em 2019 (**Apêndice**). Dos 23 compostos exclusivos das amostras de 2017, apenas um foi identificado em todos os indivíduos (α -Tocoferol), 16 compostos estavam presentes apenas nos indivíduos correspondentes ao **padrão 1** e três compostos foram identificados em apenas um macho do **padrão 2** de 2017. Para a comparação estatística da composição das secreções entre 2017 e 2019 foram utilizados apenas os indivíduos

de 2017 que se enquadravam no **padrão 2**, mesmo padrão de todos os indivíduos de 2019. Quinze compostos lipofílicos, representando entre 57,23% e 84,04% das secreções, foram identificados em, pelo menos, três indivíduos que representaram o **padrão 2** de cada ano amostrado. Os machos de 2017 apresentaram maiores quantidades do *cholesta-3,5-dien-7-one* (ANOVA: $F_{1,7} = 6,5$ e $p = 0,04$), enquanto os de 2019 apresentaram maiores quantidades do *stigmasta-4,6,22-trien-3.beta.-ol* (ANOVA: $F_{1,6} = 20,9$ e $p = 0,006$). Três componentes principais explicaram 85,86% da variação entre os machos do **padrão 2** coletados em 2017 e 2019 (**Figura 6**), o PC1 explicou 55,63% da variação e apresentou correlação significativa e positiva com o hexadecanal. O PC2 explicou 17,45% da variação e apresentou correlação significativa e positiva com o *Anthiaergosta-5,7,9,14-tetraene* e um esteroide não identificado e negativa com a hexadecanamida. Na análise discriminante todos os indivíduos de 2019 foram classificados corretamente e dois indivíduos de 2017 foram classificados como provenientes de 2019.

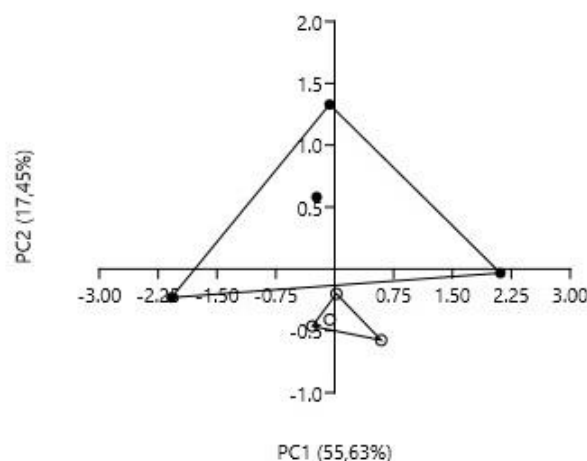


Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação de machos de *Ameivula pyrrhogularis* do **padrão 2** com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 15 compostos lipofílicos. Círculos fechado: 2017. Círculos abertos: 2019.

Sete machos de 2017 representaram o **padrão 1** (CRC Média \pm SD: $7,92 \pm 0,96$ cm) nos quais foram identificados 59 compostos lipídicos (**Tabela 6**): um álcool, α -Tocoferol, esqualeno, três cetonas, três amidas, quatro ácidos graxos, nove aldeídos, 12 ésteres e 25 esteroides. Os esteroides representaram entre 64,32% e 88,04% das secreções. Em todos os machos do **padrão 1** os dois esteroides mais abundantes foram o colesterol (Média \pm SD: $17,1 \pm 4,23$ %) e o *cholesta-3,5-dien-7-one* (Média \pm SD: $24,42 \pm 9,04$ %). A segunda classe de compostos mais abundantes no **padrão 1** foram os ésteres de ácidos graxos (Média \pm SD: $8,81 \pm 2,12$ %), principalmente os derivados

dos ácidos graxos de 16 e 18 carbonos. Dos 59 compostos identificados, 40 foram encontrados em três ou mais machos e a diferença mais significativa entre os machos do **padrão 1** foi a presença de grandes quantidades de 13-Docosenamida em dois indivíduos (TIC = 12,62 % e 15,28%), enquanto os demais apresentam menos de 5,13% desta amida.

Oito machos representaram o **padrão 2** (CRC Média \pm SD: 8,88 \pm 1,01 cm) nos quais foram identificados 58 compostos lipofílicos (**Tabela 6**): α -Tocoferol, esqualeno, duas cetonas, quatro álcoois, quatro amidas, cinco aldeídos, nove ácidos graxos, 10 ésteres de ácidos graxos e 22 esteroides. Os ácidos graxos representaram entre 5,75% e 75,08% da secreção dos machos do **padrão 2** e, com exceção de um macho, o ácido hexadecanóico foi o mais abundante, seguido pelos ácidos 9-octadecenóico e octadecanóico. Todos os machos apresentaram colesterol (Média \pm SD: 15,03 \pm 7,63%). O esqualeno não foi identificado em apenas uma das amostras e nas demais representou menos de 3% das secreções. Além das diferenças comentadas na comparação entre as amostras obtidas em 2017 e 2019, um macho do **padrão 2** apresentou significativa quantidade de amidas (TIC = 11,37%). Não há diferenças estatísticas em relação ao CRC dos machos dos dois padrões (ANOVA: $F_{1,14} = 2,9$ e $p = 0,1$). Comparando a porcentagem de cada classe de composto entre os dois padrões (**Tabela 7**) machos do **padrão 1** apresentaram maiores quantidades de aldeídos (ANOVA: $F_{1,14} = 6,87$ e $p = 0,02$), de ésteres (Mann-Whitney: $U = 0,01$), de esteroides (Mann-Whitney: $U = 0,006$) e de α -Tocoferol (Mann-Whitney: $U = 0,01$) e menores quantidades de ácidos graxos (Mann-Whitney: $U = 0,0001$) e álcoois (Mann-Whitney: $U = 0,02$).

Dos 72 compostos identificados na espécie, 45 foram compartilhados pelos dois padrões e apenas 28 compostos lipídicos foram identificados em três, ou mais, machos de cada um dos padrões e foram utilizados para as comparações estatísticas. Machos do **padrão 1** apresentaram 13 compostos exclusivos (**Tabela 6**) que representaram entre 0,34% e 8,25% das secreções e os machos do **padrão 2** apresentaram 14 compostos exclusivos que somaram entre 0 e 18,75% das secreções. Machos do **padrão 1** apresentaram maiores porcentagens de ocatadecanal (ANOVA: $F_{1,11} = 10,28$ e $p = 0,008$), anthiaergosta-5,7,9,14-tetraene (ANOVA: $F_{1,13} = 10,03$ e $p = 0,008$), cholesta-3,5-dien-7-one (Mann-Whitney: $U = 0,04$), cholest-4-em-3-one (ANOVA: $F_{1,11} = 18,55$

e $p = 0,001$) e cholesta-4,6-dien-3-one (Mann-Whitney: $U = 0,009$) e menores quantidades do derivado do cholesta-5,7-dien-3-ol (ANOVA: $F_{1,7} = 5,75$ e $p = 0,04$).

Tabela 7. Média e desvio padrão da somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada classe de compostos para os dois padrões químicos de machos adultos de *Ameivula pyrrhogularis*.

	padrão 1		padrão 2	
	Média	SD	Média	SD
aldeídos	2,33	0,74	1,2	0,91
ácidos	0,74	1,38	31,89	20,47
ésteres	8,81	2,11	3,29	4,1
cetonas	0,08	0,17	0,26	0,53
amidas	5,65	5,98	3,54	3,2
esteroides	77,35	8,17	56,74	18,53
tocoferol	3,38	1,02	1,09	1,46
álcoois	0,01	0,03	0,35	0,32
esqualeno	1,72	1,7	1,47	1,02

Cinco componentes principais explicaram 82,51% da variação entre os dois padrões (**Figura 7**). O PC1 apresentou correlação significativa e positiva com os ésteres metílicos dos ácidos hexadecanóico e octadecanóico e o PC2 apresentou correlação significativa e negativa com o éster metílico do ácido 9-Octadecenóico e com o Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester. A análise discriminante categorizou corretamente aproximadamente 67% dos machos, classificando de forma incorreta dois machos do **padrão 1** e três do **padrão 2**.

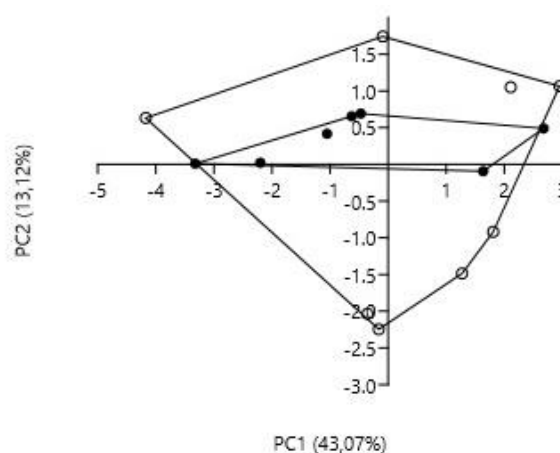


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos de *Ameivula pyrrhogularis* dos dois padrões químicos com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 28 compostos lipofílicos. Círculos fechados: padrão 1. Círculos abertos: padrão 2.

Machos de *Ameivula sp. nov. 1*

Na **Tabela 8** são apresentadas as informações de ano de coleta, identificação, comprimento rostro-cloacal, número de poros femorais totais, estado das gônadas e número de compostos lipídicos identificados em cada uma das 26 amostras de machos de *Ameivula sp. nov. 1*. Cinco machos apresentaram menos de 20 compostos lipídicos identificados e por isso não foram incluídos nas demais comparações. No total foram identificados 88 compostos lipídicos: o esqualeno, o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, dois álcoois, duas formas do tocoferol, três amidas, três cetonas, 10 ácidos graxos, 16 ésteres de ácidos graxos, 20 aldeídos e 30 esteroides (**Tabela 9**). O número de compostos identificados por indivíduos variou entre 22 e 58 (**Apêndice**). Os machos de *Ameivula sp. nov. 1* se dividiram em dois padrões (**padrão 1** – maiores porcentagens de esteroides e amida e **padrão 2** – maiores porcentagens de ácidos graxos e essa divisão está relacionada com o ano de coleta.

Tabela 8. Dados de ano de coleta, identificação (MTR), comprimento rostro-cloacal em centímetros (CRC), número total de poros femorais, estado das gônadas e número total de compostos lipofílicos identificados nas amostras de machos adultos de *Ameivula sp. nov. 1*.

Ano	MTR	CRC	poros	Gônadas	Compostos
2017	39544	10,5	16	opacos e enovelados	9
	39540	9,8	20	opacos e enovelados	30
	39545	10,62	18	opacos e enovelados	4
	39539	10,63	20	opacos e enovelados	25
	39547	8,45	16	opacos e enovelados	6
	39552	9,21	22	opacos e enovelados	38
	39650	11,02	19	opacos e enovelados	32
	39651	9,32	19	opacos e enovelados	39
	39654	10,76	16	opacos e enovelados	58
	39655	10,78	17	opacos e enovelados	24
	39656	10,17	17	opacos e enovelados	26
	39657	10,16	19	opacos e enovelados	43
	39658	8,89	18	opacos e enovelados	22
	39659	8,11	16	opacos e enovelados	25
2019	-	11,1	-	esperma na cloaca	43
	-	11,2	-	esperma na cloaca	40
	-	11,3	-	esperma na cloaca	46
	-	11,6	-	esperma na cloaca	40

-	10,9	-	esperma na cloaca	37
-	9,9	-	esperma na cloaca	20
-	9,1	-	esperma na cloaca	19
-	9	-	esperma na cloaca	12
-	11,6	-	esperma na cloaca	28
-	10,8	-	esperma na cloaca	30
-	10	-	esperma na cloaca	22
-	10,5	-	esperma na cloaca	26
-	-	-	esperma na cloaca	22
-	11	-	esperma na cloaca	23
-	11,7	-	esperma na cloaca	32
-	10,1	-	esperma na cloaca	33

Nos machos do **padrão 1** (2017) foram identificados 76 compostos lipofílicos: o esqualeno, o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, duas formas do tocoferol, duas cetonas, três amidas, oito ácidos graxos, 12 aldeídos, 20 ésteres e 27 esteroides (**Tabela 9**). Vinte e cinco compostos, somando TIC entre 2,71% e 13,94%, foram identificados com exclusividade nos machos coletados em 2017: uma amida não identificada, γ -Tocoferol, ácido decanóico, duas cetonas, quatro aldeídos, cinco esteroides, 11 ésteres. Com exceção de um macho, os esteroides corresponderam a maior porcentagem das secreções femorais (TIC entre 33,11% e 84,93%) e os quatro esteroides mais abundantes nesses machos foram o cholesta-3,5-diene (TIC entre 0 e 10,79%), o colesterol (TIC entre 10,44% e 28,7%), o campesterol (TIC entre 0,91% e 13,48%) e o cholest-4-en-3-one (TIC entre 0,46% e 10%). Há machos com quantidades significativas de ésteres, amidas, tocoferol e esqualeno. Nos machos do **padrão 2** (2019) foram identificados 63 compostos: o esqualeno, o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, o α -Tocoferol, uma cetona, duas amidas, dois álcoois, nove ácidos graxos, nove ésteres de ácidos graxos, 12 aldeídos e 25 esteroides (**Tabela 9**). Doze compostos, somando TIC entre 0,91% e 3,12%, foram identificados apenas nos indivíduos coletados em 2019: uma cetona, dois álcoois, dois ácidos graxos, três esteroides e quatro aldeídos. Os machos de 2019 apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos (TIC > 8,55%) e esteroides (TIC > 18,01%). Há machos com significativas quantidades de aldeídos, ésteres de ácidos graxos e esqualeno.

Tabela 9. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreções femorais de machos adultos de *Ameivula sp. nov. 1* do município de Casa Nova, Bahia. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a média e o desvio padrão (SD) de sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) para os dois padrões químicos identificados na espécie. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	2017		2019	
		Média	SD	Média	SD
4.0	Hexanal	-	-	0,01	0,02
4.2	Hexanol	-	-	0,90	0,79
12.4	2-Nonenal	0,11	0,17	0,01	0,02
15.8	4-Decenal	0,12	0,15	0,07	0,15
16.4	Decanal	0,00	0,02	-	-
19.3	2,4-Decadienal	-	-	0,01	0,04
20.2	Ácido Decanóico	0,01	0,03	-	-
27.2	Tridecanal	-	-	0,01	0,02
29.0	Tridecanol	-	-	0,001	0,003
29.1	Pentadecanal	0,15	0,28	0,11	0,16
29.6	Metil Éster do Ácido Tetradecanóico	0,002	0,01	-	-
30.6	Ácido Tetradecanóico	0,06	0,20	0,34	0,52
31.0	Etil Éster do Ácido Tetradecanóico	0,08	0,15	-	-
31.8	Hexadecanal	0,80	0,60	0,98	0,66
32.8	Ácido Pentadecanóico	0,11	0,25	0,05	0,09
33.2	Aldeído não identificado	0,06	0,17	0,07	0,15
32.6	Etil Éster do Ácido Pentadecanóico	0,01	0,03	-	-
33.8	2-Heptadecanona	0,18	0,39	-	-
34.1	Heptadecanal	0,17	0,27	0,13	0,20
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,39	0,52	1,05	1,61
34.6	Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	0,34	0,49
34.9	Ácido Hexadecanóico	2,79	6,08	19,07	9,16
35.0	9,12-Octadecadienal	-	-	0,01	0,03
35.1	Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	0,06	0,19	-	-
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	2,59	2,30	2,72	2,20
35.6	9-Octadecenal	0,34	0,77	1,56	1,84
36.1	Octadecanal	2,13	1,35	1,45	0,99
36.8	Ácido graxo não identificado	-	-	0,11	0,16
36.9	Ácido Heptadecanóico	0,02	0,06	0,39	0,67
37.5	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,12	0,19	0,27	0,77
37.6	Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,18	0,30	0,52	1,40
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,05	0,11	0,47	0,86
38.3	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	0,05	0,15	0,09	0,16
38.4	Nonadecanal	0,05	0,08	-	-
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,56	1,87	2,89	2,19
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	2,38	7,82	7,67	5,25
39.0	Ácido Octadecanóico	0,83	2,58	4,92	3,13
39.1	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	1,92	1,21	-	-

39.2	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	2,18	1,34	0,49	1,29
39.4	Hexadecanamida	0,71	2,01	1,84	1,54
39.5	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	1,31	1,51	1,70	0,78
40.4	Aldeído não identificado	0,98	1,65	-	-
40.7	Eicosanal	0,19	0,24	-	-
41.6	9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	0,48	0,76	-	-
41.7	Cetona não identificada	-	-	0,07	0,26
41.8	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	0,15	0,50	0,03	0,10
41.9	Amida não identificada	0,36	1,20	-	-
42.1	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,01	0,05	0,04	0,10
43.2	Cetona não identificada	0,04	0,14	-	-
44.6	Metil Éster do Ácido 10,13-Eicosadienóico	0,08	0,18	-	-
44.8	Metil Éster do Ácido 11-Eicosenóico	0,04	0,14	-	-
45.0	Etil Éster do Ácido Eicosanóico	0,01	0,04	-	-
45.2	9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	0,29	0,44	-	-
46.2	Octadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,03	0,10	-	-
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,84	0,77	0,73	0,83
49.1	13-Docosenamida	8,10	9,50	0,27	0,73
49.6	Esqualeno	7,02	9,69	6,26	5,93
50.2	Cholesta-2,4-diene	0,09	0,21	-	-
50.3	Derivado do Cholesta-2,4-diene	1,74	1,02	0,79	0,88
50.5	Cholesta-4,6-dien-3-ol	1,23	1,25	1,56	1,26
50.8	Cholesta-3,5-diene	4,59	3,64	4,22	4,15
51.9	Ergosta-4,6,22-triene	0,51	0,69	0,01	0,03
52.3	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	2,30	1,95	2,54	2,47
52.4	Anthiaergosta-5,7,9,14-tetraene	0,91	0,71	-	-
52.5	Stigmasta-3,5-diene	0,32	0,80	0,95	0,99
53.0	γ -Tocoferol	0,04	0,13	-	-
53.8	Esteróide não identificado (155, 251, 377, 392)	3,03	2,34	2,65	1,83
53.9	Colesterol	16,36	7,59	14,85	6,55
54.1	α -Tocoferol	5,89	3,34	1,57	2,57
54.2	Colestanol	-	-	0,38	0,89
54.3	Latosterol	-	-	0,02	0,07
55.3	Ergosta-7,22-dien-3-ol	0,39	0,90	0,19	0,63
55.4	Ergosterol	2,11	1,33	0,57	0,93
55.6	Cholesta-3,5-dien-7-one	2,83	1,69	0,75	1,05
55.7	Campesterol	6,82	3,77	4,01	2,32
56.0	Cholest-4-en-3-one	3,97	3,74	0,24	0,29
56.1	Stigmasterol	0,53	0,91	0,65	0,98
56.4	Ergosta-5,8-dien-3-ol	0,001	0,003	-	-
56.5	Cholesta-4,6-dien-3-one	1,32	1,23	0,18	0,27
56.8	Stigmasta-4,6,22-trien-3.beta.-ol	0,95	1,72	2,57	2,67
57.2	γ -Sitosterol	1,79	2,07	1,10	1,50
57.8	Lanosterol	0,35	0,60	0,79	1,57
58.0	4-Campestene-3-one	0,71	1,26	-	-
58.1	Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	1,25	2,08	1,39	2,34

58.2	Éster do Ácido Hexadecanóico (257, 446)	-	-	0,02	0,06
58.4	Derivado do γ -Sitosterol	0,40	0,79	0,38	0,79
58.6	γ -Sitostenone	0,21	0,71	-	-
58.8	Derivado do Stigmasterol	0,20	0,61	-	-

Os machos coletados em 2017 (Média \pm SD: 9,89 \pm 0,92 cm) apresentaram menor CRC que os machos coletados em 2019 (Média \pm SD: 10,9 \pm 0,61 cm) (ANOVA: $F_{1,22} = 10,06$ e $p = 0,004$). Comparando a secreção femoral em relação à importância de cada uma das classes de compostos identificadas nas secreções (**Tabela 10**), os machos de 2019 apresentaram maior quantidade de ácidos graxos (Mann-Whitney: $U = 0,0001$) e menores quantidades de esteroides (ANOVA: $F_{1,23} = 4,8$ e $p = 0,03$), de amidas (Mann-Whitney: $U = 0,01$) e de formas do tocoferol (Mann-Whitney: $U = 0,003$).

Tabela 10. Média e desvio padrão da somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada classe de compostos para os dois padrões (2017 e 2019) químicos de machos adultos de *Ameivula sp. nov. 1*.

	2017		2019	
	Média	SD	média	SD
Aldeídos	5,1	3,28	4,4	2,65
Ácidos	6,75	18,5	35,79	18,19
Ésteres	10,03	7,19	7,34	7,28
Cetonas	0,21	0,49	0,07	0,26
Amidas	9,16	9,16	2,1	2,09
Esteroides	55,74	18,67	41,5	13,85
Tocopherol	5,93	3,4	1,57	2,56
Álcoois	-	-	0,89	0,78
Esqualeno	7,02	9,68	6,25	5,92
Outros	0,01	0,04	0,03	0,09

Sete compostos exclusivos dos machos de 2019 e 16 dos machos de 2017 foram identificados apenas em um indivíduo. Trinta e três compostos estavam presentes em três ou mais machos de cada ano de coleta e foram utilizados para as comparações estatísticas. Com exceção de um macho de 2017 (TIC = 49,68%), esses 33 compostos representaram entre 62,87% e 93,83% das secreções femorais. Nove compostos compartilhados pela maioria dos indivíduos apresentaram diferenças estatísticas entre as amostras de 2017 e 2019. Machos de 2017 apresentaram, em média, maiores

porcentagens de 2-Nonenal (ANOVA: $F_{1,7} = 8,75$ e $p = 0,2$), 13-Docosenamida (ANOVA: $F_{1,12} = 5,56$ e $p = 0,3$), derivado do cholesta-2,4-diene (ANOVA: $F_{1,21} = 6,09$ e $p = 0,2$), α -Tocoferol (ANOVA: $F_{1,14} = 4,98$ e $p = 0,04$), cholesta-4,6-dien-3-one (ANOVA: $F_{1,10} = 23,19$ e $p = 0,001$), cholest-4-en-3-one (ANOVA: $F_{1,16} = 23,8$ e $p = 0,001$) e cholesta-3,5-dien-7-one (Mann-Whitney: $U = 0,001$). Machos de 2019 apresentaram, em média, maiores quantidades do ácido hexadecanóico (Mann-Whitney: $U = 0,04$) e do éster etílico do ácido octadecanóico (Mann-Whitney: $U = 0,005$). Sete componentes principais explicaram 81,42% da variação entre os dois anos (**Figura 8**). O PC1 explicou 41,66% e apresentou correlação significativa e positiva com o 4-Decenal e o pentadecanal. O PC2 explicou apenas 9,76% da variação e teve correlação positiva com o derivado do cholest-5-en-3-ol e o cholesta-4-en-3-one. Na análise discriminante foram classificados corretamente 84% dos machos, com dois machos de cada padrão sendo classificados erroneamente.

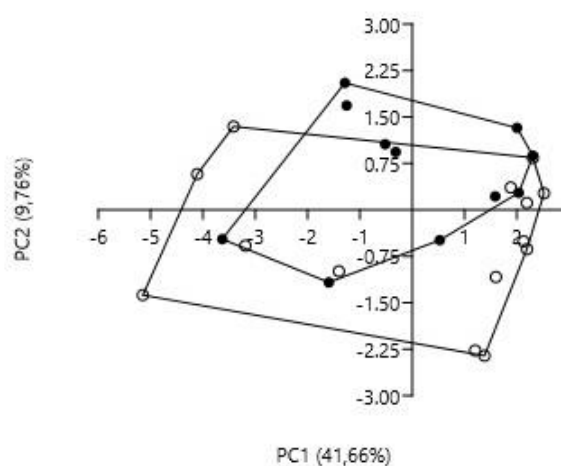


Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos de *Ameivula sp. nov. 1* de acordo com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 33 compostos lipofílicos. Círculos fechados: 2017 (padrão 1). Círculos abertos: 2019 (padrão 2).

Machos de *Ameivula sp. nov. 2*

Dos 23 machos de *Ameivula sp. nov. 2*, apenas um não apresentou bons resultados de CG-MS e por isso não foi incluído nas demais comparações. Na **Tabela 11** são apresentadas as informações de ano de coleta, identificação, comprimento rostro-cloacal, número de poros femorais totais, estado das gônadas e número de compostos lipídicos identificados em cada uma das 22 amostras de machos de *Ameivula sp. nov. 2* que apresentaram bons resultados.

Tabela 11. Dados de ano de coleta, identificação (MTR), comprimento rostro-cloacal em centímetros (CRC), número total de poros femorais, estado das gônadas e número total de compostos lipofílicos identificados nas amostras de machos adultos de *Ameivula sp. nov. 2*.

Ano	MTR	CRC	poros	Gônadas	Compostos
2018	41672	6,9	17	opacos e enovelados	33
	41615	7,2	16	opacos e enovelados	23
	41679	7,7	17	opacos e enovelados	24
	41614	8	14	opacos e enovelados	31
	41659	8,7	20	opacos e enovelados	38
	41680	8,7	17	opacos e enovelados	25
	41658	9	19	opacos e enovelados	31
2019	-	7,2	-	esperma na cloaca	17
	-	7,4	-	esperma na cloaca	19
	-	7,5	-	esperma na cloaca	29
	-	7,5	-	esperma na cloaca	21
	-	8,1	-	esperma na cloaca	27
	-	8,1	-	esperma na cloaca	26
	-	8,2	-	esperma na cloaca	24
	-	8,4	-	esperma na cloaca	28
	-	8,5	-	esperma na cloaca	35
	-	8,5	-	esperma na cloaca	27
	-	8,6	-	esperma na cloaca	29
	-	8,9	-	esperma na cloaca	35
	-	9	-	esperma na cloaca	32
-	9,1	-	esperma na cloaca	24	
-	9,1	-	esperma na cloaca	41	

No total foram identificados 69 compostos lipofílicos em machos adultos de *Ameivula sp. nov. 2*: um álcool, o esqualeno, o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, três amidas, duas formas do tocoferol, cinco cetonas, nove aldeídos, 12 ésteres de ácidos graxos, 13 ácidos graxos e 22 esteroides (**Tabela 12**). O número de compostos identificados por indivíduo variou entre 17 e 41, sendo que apenas dois machos apresentaram menos de 20 e um macho apresentou mais de 40 compostos (**Apêndice**). Em *Ameivula sp. nov. 2* sete machos apresentaram porcentagens significativas de esqualeno, elevadas porcentagens do ácido hexadecanóico e porcentagens bem baixas dos ácidos graxos de 18 carbonos (**padrão 1**). O **padrão 2** é representado por 15 machos que apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos, quantidades muito

baixas de esqualeno e apresentam compostos lipofílicos que não foram observados nos machos do **padrão 1**.

Tabela 12. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreções femorais de machos adultos de *Ameivula sp. nov. 2* do município de Barra, Bahia. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a média e o desvio padrão (SD) de sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) para os dois padrões químicos identificados na espécie. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	TIC (%)			
		padrão 1		padrão 2	
		Média	SD	Média	SD
4.2	Hexanal	-	-	0,05	0,14
4.6	Hexanol	1,39	1,29	0,34	0,35
15.7	4-Decenal	-	-	0,05	0,15
18.6	2-Decanona	-	-	0,01	0,01
19.3	2,4-Decadienal	-	-	0,01	0,01
20.2	Ácido Decanóico	-	-	0,01	0,01
24.2	2-Dodecanona	-	-	0,01	0,01
26.9	Ácido Tridecanóico	-	-	0,02	0,04
29.2	2-Tridecanona	-	-	0,01	0,01
29.5	Pentadecanal	0,17	0,29	0,06	0,12
30.6	Ácido Tetradecanóico	0,41	0,75	0,08	0,13
31.8	Hexadecanal	1,96	0,89	0,85	0,67
32.4	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	0,02	0,06	0,03	0,04
32.8	Ácido Pentadecanóico	-	-	0,05	0,08
33.7	2-Heptadecanona	-	-	0,01	0,01
34.1	Heptadecanal	0,19	0,33	0,03	0,08
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,70	0,56	0,28	0,30
34.5	14-Methyl-8-Hexadecenal	-	-	0,10	0,40
34.6	Ácido 9-Hexadecenóico	0,63	1,67	0,36	0,58
35.2	Ácido Hexadecanóico	12,48	4,93	19,76	11,53
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	4,03	2,97	1,58	1,56
35.6	9-Octadecenal	1,44	0,73	0,62	0,65
35.9	Éster não identificado do Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	0,09	0,36
36.1	Octadecanal	2,68	1,66	0,80	0,77
36.5	Ácido graxo não identificado	-	-	0,13	0,38
36.9	Ácido Heptadecanóico	-	-	0,30	0,37
37.5	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,05	0,12	0,09	0,19
37.6	Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,29	0,51	0,20	0,25
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,38	0,42	0,21	0,22
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,75	0,64	3,45	3,79

38.6	Ácido 9-Octadecenóico	1,90	1,90	11,78	7,41
39.0	Ácido Octadecanóico	0,29	0,77	6,87	4,28
39.1	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,24	0,62	-	-
39.2	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	1,66	1,23	0,24	0,67
39.4	Hexadecanamida	0,88	1,36	1,42	1,31
39.5	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	1,32	0,81	0,79	0,85
39.7	Ácido Eicosanóico	-	-	0,22	0,60
41.5	Éster não identificado do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	0,07	0,18
41.8	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	0,04	0,10
42.1	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	-	0,04	0,10
43.4	Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	0,04	0,09
44.8	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	-	-	0,01	0,03
48.8	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,91	1,25	0,06	0,14
49.0	13-Docosenamida	0,19	0,51	0,15	0,32
49.5	Esqualeno	10,51	4,68	2,66	1,80
50.3	Derivado do Cholesta-2,4-diene	1,37	2,21	0,18	0,36
50.5	Cholesta-4,6-dien-3-ol	2,68	1,82	0,77	0,52
50.8	Cholesta-3,5-diene	8,31	9,65	1,89	2,01
51.9	Ergosta-4,6,22-triene	0,82	2,16	0,06	0,15
52.3	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0,69	1,81	0,42	0,91
52.4	Amida não identificada	-	-	0,02	0,09
52.5	Stigmasta-3,5-diene	-	-	0,41	0,58
53.0	γ -Tocoferol	-	-	0,04	0,16
53.7	Esteróide não identificado (155, 197, 251, 377, 392)	1,41	1,12	1,02	0,96
53.9	Colesterol	19,49	9,03	20,33	8,57
54.1	α -Tocoferol	7,07	7,67	0,21	0,80
54.2	Cholest-7-en-3-ol	-	-	0,01	0,03
54.5	Desmosterol	3,07	1,64	2,15	1,45
55.2	Ergosterol	0,36	0,95	0,29	0,53
55.3	Cholesta-3,5-dien-7-one	0,31	0,61	0,25	0,39
55.6	Campesterol	6,20	4,63	6,53	4,23
55.8	Cholest-4-en-3-one	-	-	0,80	3,10
56.0	Stigmasterol	0,66	1,13	1,28	2,03
56.5	Cholesta-4,6-dien-3-one	0,14	0,38	0,07	0,26
56.8	Stigmasta-4,6,22-trien-3.beta.-ol	0,86	2,27	3,57	2,72
57.2	γ -Sitosterol	0,39	1,04	2,57	2,28
57.8	Lanosterol	-	-	0,10	0,38
58.1	Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	0,71	1,23	2,18	2,44
58.4	Derivado do γ -Sitosterol	-	-	0,89	1,43

Três compostos foram identificados apenas nos indivíduos coletados em 2019: éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico – em cinco indivíduos, derivado do

cholesta-2,4-diene – em nove indivíduos e o derivado do ergost-5-en-3-ol – em cinco indivíduos. Dos 16 compostos observados apenas em 2018, sete deles foram encontrados em apenas um indivíduo, cinco compostos em apenas dois indivíduos, três compostos apenas em três indivíduos e um único composto (ácido tridecanóico) foi observado em seis, dos sete, machos de 2018. Apenas um macho de 2018 apresentou o **padrão 1** e as comparações entre 2018 e 2019 foram realizadas apenas com os indivíduos que se enquadraram no **padrão 2**.

Vinte e quatro compostos lipídicos, representando entre 79,75% e 99% das secreções, foram identificados em, pelo menos, três indivíduos de cada ano de coleta que representaram o **padrão 2**. Os machos de 2019 apresentaram maiores porcentagens do ácido hexadecanóico (Mann-Whitney: $U = 0,014$) e de hexadecanamida (Mann-Whitney: $U = 0,008$) e menores porcentagens de colesterol (Mann-Whitney: $U = 0,04$). Cinco componentes principais explicaram 82,89% da variação na composição lipídica entre os machos do **padrão 2** coletados em 2018 e 2019 (**Figura 9**). O PC1 explicou 29,68% da variação e teve correlação significativa e positiva com o hexanol e o PC2 explicou 16,6% da variação e teve correlação significativa e positiva com o éster metílico do ácido hexadecanóico e negativa com o ácido decanóico e com a 2-Pentadecanona. A análise discriminante identificou corretamente 73,3% dos machos, classificando três machos de 2018 e um de 2019 erroneamente. Com base nesses resultados, os indivíduos foram separados por padrões, independente do ano de obtenção da amostra.

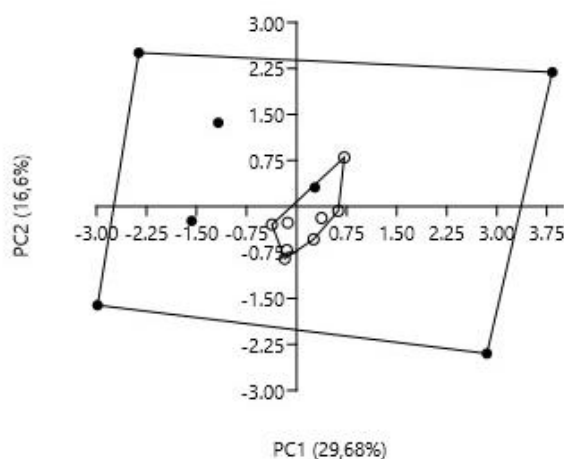


Figura 9. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos de *Ameivula sp. nov.* 2 do **padrão 2** com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 24 compostos lipofílicos. Círculos fechados: 2018. Círculos abertos: 2019.

Sete machos representaram o **padrão 1** (CRC Média \pm SD: 7,81 \pm 0,7 cm) nos quais foram identificados 42 compostos lipídicos (**Tabela 12**): um álcool, α -Tocoferol, esqualeno, uma cetona, duas amidas, seis ácidos graxos, cinco aldeídos, oito ésteres de ácidos graxos e 17 esteroides. Os esteroides representaram entre 22% e 67% das secreções, sendo os mais abundantes o cholesta-4,6-dien-3-ol (TIC Média \pm SD: 2,68 \pm 1,82%), o cholesta-3,5-diene (TIC Média \pm SD: 8,31 \pm 9,65%), o colesterol (TIC Média \pm SD: 19,49 \pm 9,03%) e o campesterol (TIC Média \pm SD: 6,2 \pm 4,63%). A segunda classe de compostos mais abundante foi a dos ácidos graxos, entre 8,56% e 23,91% das secreções, principalmente o hexadecanóico (TIC entre 6,88% e 19,35%). Os machos do **padrão 1** apresentaram significativas quantidades de esqualeno (TIC Média \pm SD: 10,51 \pm 4,68%), de ésteres de ácidos graxos (TIC entre 4,33% e 19,34%) e de aldeídos (TIC entre 3,11% e 11,88%). Dos 42 compostos identificados, 12 foram identificados em seis ou sete machos, quatro compostos foram identificados em cinco indivíduos e os demais foram encontrados em quatro ou menos machos. Em quatro machos do **padrão 1** foi identificado α -Tocoferol e nesses indivíduos o composto representou entre 5,01% e 16,64% das secreções.

Quinze machos representaram o **padrão 2** (CRC Média \pm SD: 8,37 \pm 0,63 cm) nos quais foram identificados 68 compostos lipídicos (**Tabela 12**): um álcool, o esqualeno, o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, o esqualeno, três amidas, duas formas do tocoferol, cinco cetonas, nove aldeídos, 11 ésteres de ácidos graxos, 13 ácidos graxos e 22 esteroides. Os ácidos graxos representaram entre 18,45% e 69,88% das secreções desses machos, principalmente os ácidos de 16 e 18 carbonos. Os esteroides representaram entre 14% e 72% das secreções, sendo os mais abundantes o colesterol (TIC Média \pm SD: 20,33 \pm 8,57%), o campesterol (TIC Média \pm SD: 6,53 \pm 4,23%), stigmasta-4,6,22-trien-3beta-ol (TIC Média \pm SD: 3,57 \pm 2,72%) e o γ -Sitosterol (TIC Média \pm SD: ,57 \pm 2,28%). O esqualeno representou menos de 6% das secreções dos machos do **padrão 2** e ésteres e aldeídos representaram, respectivamente, menos de 5,5% e 7,5% das secreções. Um macho apresentou 3,11% de α -Tocoferol e outro macho apresentou 0,62% de γ -Tocoferol.

Não há diferenças estatísticas em relação ao CRC dos machos dos dois padrões (ANOVA: $F_{1,20} = 0,59$ e $p = 0,4$). Comparando a porcentagem de cada classe de composto entre os dois padrões (**Tabela 13**): machos do **padrão 1** apresentaram

maiores quantidades de aldeídos (ANOVA: $F_{1,20} = 16,46$ e $p = 0,001$), de ésteres (Mann-Whitney: $U = 0,02$), de álcoois (Mann-Whitney: $U = 0,01$) e de esqualeno (Mann-Whitney: $U = 0,0001$) e menores quantidades de ácidos graxos (Mann-Whitney: $U = 0,0001$).

Tabela 13. Média e desvio padrão da somatória da porcentagem relativa de cada classe de compostos para os dois padrões químicos de machos adultos de *Ameivula sp. nov. 2*.

	padrão 1		padrão 2	
	Média	SD	Média	SD
aldeídos	6,43	2,67	2,58	1,75
ácidos	16,45	6,94	43,02	15,66
ésteres	8,65	5,34	3,63	2,78
cetonas	0,02	0,05	0,03	0,03
amidas	1,07	1,76	1,59	1,4
esteroides	48,28	18,19	45,86	18,45
tocoferol	7,06	7,67	0,24	0,8
álcoois	1,38	1,29	0,33	0,35
esqualeno	10,5	4,68	2,66	1,8

Dos 69 compostos identificados na espécie, o **padrão 1** apresentou um único composto exclusivo, o etil éster do ácido 9,12-octadecadienóico, que representou apenas 1,65% da secreção de um único macho. Os machos do **padrão 2** apresentaram 27 compostos que não foram identificados no **padrão 1**, incluindo esteroides, ésteres de ácidos graxos, ácidos e aldeídos. Dos 41 compostos compartilhados pelos dois padrões, 21 foram identificados em três ou mais indivíduos de cada padrão e foram utilizados para as comparações estatísticas. Esses 21 compostos representaram entre 74,9% e 91,92% das secreções dos machos do **padrão 1** e entre 59,05% e 85,05% dos machos do **padrão 2**.

Onze compostos apresentaram diferenças estatísticas. O ácido 9-octadecenóico foi o único composto encontrado em maiores porcentagens nos machos do **padrão 2** (Mann-Whitney: $U = 0,004$). No **padrão 1** foram encontradas maiores quantidades do éster metílico do ácido hexadecanóico (ANOVA: $F_{1,13} = 5,38$ e $p = 0,03$), do derivado do cholest-5-en-3-ol (ANOVA: $F_{1,6} = 8,99$ e $p = 0,02$), do cholesta-3,5-diene (ANOVA: $F_{1,20} = 7,79$ e $p = 0,01$), do hexanol (Mann-Whitney: $U = 0,02$), do hexadecanal (Mann-

Whitney: $U = 0,03$), do octadecanal (Mann-Whitney: $U = 0,01$), do esqualeno (Mann-Whitney: $U = 0,001$), do derivado do cholest-2,4-diene (Mann-Whitney: $U = 0,02$), do cholesta-4,6-dien-3-ol (Mann-Whitney: $U = 0,001$) e do desmosterol (Mann-Whitney: $U = 0,02$). Seis componentes principais explicaram 86,05% da variação na composição lipídica entre os machos do **padrão 1** e do **padrão 2** (**Figura 10**). O PC1 explicou 25,68% da variação e teve correlação significativa e positiva com o 4-Decenal e com o ácido heptadecanóico e o PC2 explicou 20,96% da variação e teve correlação significativa com o ácido hexadecanóico. A análise discriminante indicou que os valores extraídos dos componentes principais categorizam corretamente 81,82% dos machos, classificando de forma errada apenas dois machos do **padrão 2**.

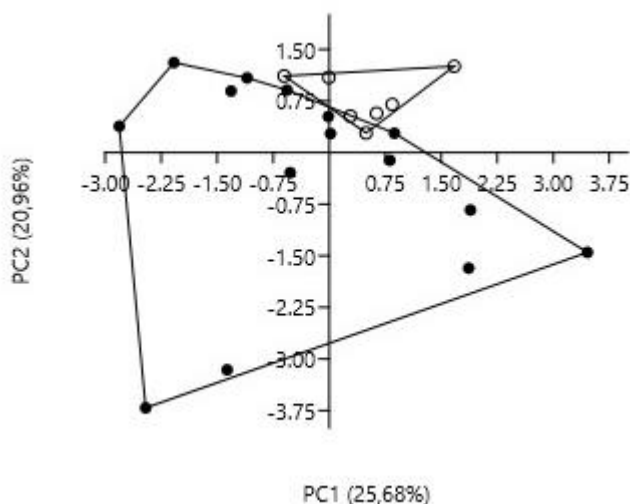


Figura 10. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos de *Ameivula sp. nov. 2* dos dois padrões químicos com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 21 compostos lipofílicos. Círculos abertos: padrão 1. Círculos fechados: padrão 2.

Comparação do padrão lipofílico entre machos

No total, foram identificados 113 compostos lipofílicos em machos de *Ameivula*. Quarenta e sete compostos foram compartilhados pelas três espécies e representaram entre 90,4% e 100% das secreções de *Ameivula sp. nov. 2*, entre 80,65% e 99,49% das secreções de *A. pyrrhogularis* e entre 84,12% e 100% das secreções de *Ameivula sp. nov. 1*. Observando apenas *Ameivula sp. nov. 2* e *A. pyrrhogularis* o número de compostos identificados foi igual a 91. Dos 22 compostos identificados apenas nos machos de *A. pyrrhogularis* (soma da TIC entre 0,51% e 12,86%), 10 compostos foram

identificados em três ou menos machos. Dos 19 compostos identificados apenas nos machos de *Ameivula sp. nov. 2* (soma da TIC entre 0 e 4,76%), 14 compostos foram identificados em três ou menos machos. *Ameivula sp. nov. 1* e *A. pyrrhogularis* somaram 103 compostos lipídicos. Quinze compostos foram identificados apenas em *A. pyrrhogularis* (soma da TIC entre 0,07% e 10,99%), mas 10 ocorreram em três ou menos machos. *Ameivula sp. nov. 1* apresentou 31 compostos exclusivos (soma da TIC entre 0 e 8,17%) e 12 compostos foram identificados em quatro ou mais machos. Em *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* foram identificados 101 compostos lipofílicos: 13 compostos exclusivos de *Ameivula sp. nov. 1* (soma da TIC entre 0 e 5,45%), sendo 9 observados em quatro ou mais machos, e 32 exclusivos de *Ameivula sp. nov. 2* (soma da TIC entre 0 e 14,14%), sendo 18 compostos observados em três ou menos machos. Em nenhuma das comparações foram identificados compostos exclusivos em grandes porcentagens.

Comparando cada classe de composto lipofílico entre as três espécies, sem separar os machos pelos padrões identificados anteriormente, foram encontradas diferenças significativas em aldeídos (ANOVA: $F_{2,59} = 6,61$ e $p = 0,03$), ácidos graxos (ANOVA: $F_{2,59} = 3,28$ e $p = 0,04$), esteroides (ANOVA: $F_{2,59} = 6,68$ e $p = 0,02$), esqualeno (ANOVA: $F_{2,59} = 3,71$ e $p = 0,03$) e amidas (ANOVA: $F_{2,59} = 3,43$ e $p = 0,04$) (**Figura 11**). *Ameivula pyrrhogularis* tem menor quantidade de aldeídos do que *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* (Tukey: $p < 0,04$), que não diferiram entre si (Tukey: $p = 0,4$). *Ameivula sp. nov. 2* apresentou maior quantidade de ácidos graxos do que *A. pyrrhogularis* (Tukey: $p = 0,04$), mas não foram encontradas diferenças entre *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 1* (Tukey: $p = 0,6$) ou entre *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* (Tukey: $p = 0,1$). *Ameivula pyrrhogularis* apresentou mais esteroides em sua secreção (Tukey: $p < 0,006$), mas não há diferenças entre a porcentagem de esteroides na secreção das outras duas espécies (Tukey: $p = 0,9$). *Ameivula sp. nov. 2* apresentou menor quantidade de amidas do que as observadas em *Ameivula sp. nov. 1* (Tukey: $p = 0,04$), que não apresentou diferenças estatísticas com *A. pyrrhogularis* (Tukey: $p = 0,9$). Esqualeno foi observado em menor porcentagem em *A. pyrrhogularis* (Tukey: $p = 0,02$) e em quantidades similares em *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* (Tukey: $p = 0,6$).

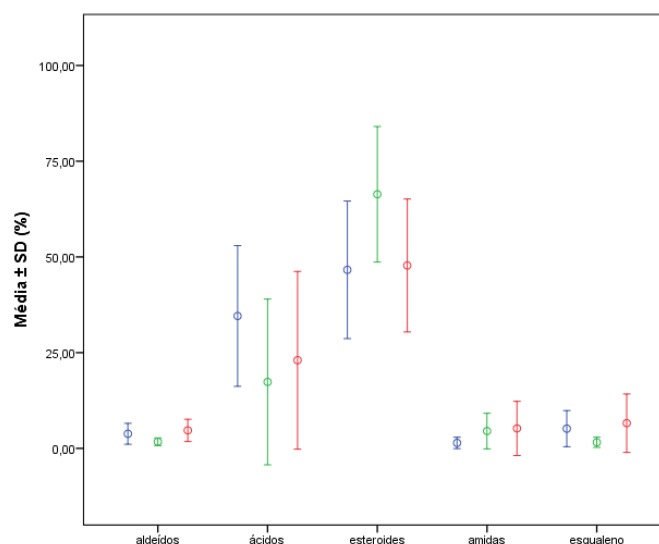


Figura 11. Média \pm desvio padrão (SD) da soma da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) das principais classes de compostos lipídicos identificados em machos adultos de três espécies de *Ameivula*. Azul: *Ameivula sp. nov. 2*. Verde: *Ameivula pyrrhogularis*. Vermelho: *Ameivula sp. nov. 1*.

O resultado da PERMANOVA na comparação entre o perfil químico das secreções femorais com todos os compostos químicos identificados em todos os machos das três espécies, revelou diferenças significativas entre elas (PERMANOVA: *pseudo* $F_{2,59} = 3,11$ e $p = 0,001$) em relação à proporção dos compostos lipídicos. A análise de CAP, com base nas distâncias euclidianas, classificou corretamente 91,93% dos machos (teste permutacional, $\delta_1^2 = 0,93$ e $p = 0,001$). Um macho de *Ameivula sp. nov. 2* foi classificado como *A. pyrrhogularis*, três de *A. pyrrhogularis* foram classificados como *Ameivula sp. nov. 1* e um macho de *Ameivula sp. nov. 1* foi classificado como *Ameivula sp. nov. 2*. Considerando todos os machos, quarenta e um compostos lipofílicos foram identificados em, pelo menos, três machos de cada uma das espécies e foram selecionados para as análises estatísticas.

Onze compostos apresentaram diferenças estatísticas entre as três espécies (**Tabela 14**). Machos de *A. pyrrhogularis* apresentaram menores quantidades de 4-Decenal, 9-Octadecenal e do éster etílico do ácido octadecanóico e maiores quantidades do cholesta-4,6-dien-3-one (ANOVA: $p < 0,02$; Tukey: $p < 0,05$), que não apresentaram diferenças significativas entre *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* (Tukey: $p > 0,1$). *Ameivula sp. nov. 2* e *A. pyrrhogularis* apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de α -Tocoferol (ANOVA: $F_{2,31} = 4,41$ e $p = 0,02$; Tukey: $p = 0,02$) e campesterol (ANOVA: $F_{2,54} = 3,32$ e $p = 0,04$; Tukey: $p = 0,03$), mas não diferiram de *Ameivula sp. nov. 1* para estes compostos (Tukey: $p > 0,1$). O cholesta-3,5-diene

apresentou diferenças entre *Ameivula sp. nov. 2* e *Ameivula sp. nov. 1* (ANOVA: $F_{2,58} = 3,64$ e $p = 0,03$; Tukey: $p = 0,02$), mas não foram detectadas diferenças neste composto quando essas espécies foram comparadas com *A. pyrrhogularis* (Tukey: $p > 0,3$). *Ameivula sp. nov. 1* e *A. pyrrhogularis* apresentaram diferenças nas quantidades de hexadecanal (ANOVA: $F_{2,51} = 4,11$ e $p = 0,02$; Tukey: $p = 0,01$) e do éster metílico do ácido hexadecanóico (ANOVA: $F_{2,39} = 3,16$ e $p = 0,04$; Tukey: $p = 0,04$), mas estes compostos não apresentaram diferenças significativas entre essas espécies e *Ameivula sp. nov. 2* (Tukey: $p > 0,1$). O único composto que diferiu simultaneamente entre as três espécies foi o cholesta-3,5-dien-7-one (ANOVA: $F_{2,40} = 14,41$ e $p = 0,001$; Tukey: $p < 0,04$).

Tabela 14. Média e desvio padrão (SD) da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos 11 compostos lipofílicos que apresentaram diferenças estatísticas entre machos adultos de três espécies de *Ameivula*.

	<i>Ameivula pyrrhogularis</i>		<i>Ameivula sp. nov. 1</i>		<i>Ameivula sp. nov. 2</i>	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
4-Decenal	0,02	0,03	0,09	0,15	0,04	0,13
Hexadecanal	0,34	0,20	0,90	0,63	1,21	0,90
Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,17	0,18	0,76	1,28	0,42	0,43
9-Octadecenal	0,17	0,28	1,02	1,57	0,88	0,76
Etil Éster do Ácido Octadecanóico	0,86	0,49	1,53	1,15	0,96	0,86
Cholesta-3,5-diene	2,68	1,53	4,38	4,64	3,94	6,22
Esteróide não identificado	1,34	0,82	2,81	2,03	1,14	1,00
α -Tocoferol	2,16	1,71	3,48	3,61	2,39	5,29
Cholesta-3,5-dien-7-one	17,63	12,87	1,67	1,70	0,27	0,46
Campesterol	2,61	1,47	5,25	3,29	6,43	4,25
Cholesta-4,6-dien-3-one	4,85	2,51	0,68	1,01	0,10	0,29

Na análise de componentes principais realizada para todos os machos, com base em 41 compostos lipofílicos, os onze primeiros componentes principais explicaram 80,52% da variação química entre as espécies (**Figura 12**). O PC1 explicou 19,67% da variação e apresentou correlação significativa e positiva com o 4-Decenal. O PC2 explicou apenas 14,48% da variação e teve correlação significativa e positiva com o hexanol e o ácido heptadecanóico. A análise discriminante, baseada nos escores dos

onze componentes principais, classificou corretamente a espécie de 72,58% dos machos de *Ameivula*. Dos 22 machos de *Ameivula sp. nov. 2*, dois machos foram classificados como *A. pyrrhogularis* e cinco como *Ameivula sp. nov. 1*. Dois machos de *A. pyrrhogularis* foram classificados como *Ameivula sp. nov. 2* e três como *Ameivula sp. nov. 1*. Dos 25 machos de *Ameivula sp. nov. 1*, cinco machos foram classificados como *Ameivula sp. nov. 2*.

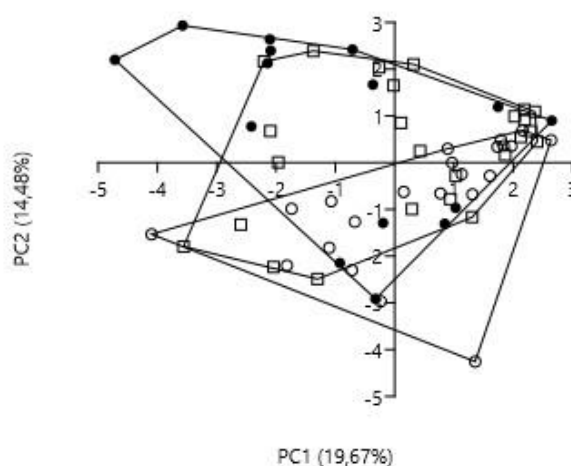


Figura 12. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos adultos de três espécies de *Ameivula* de acordo com os dois primeiros componentes principais da análise realizada com base em 41 compostos lipofílicos. Círculos fechados: *Ameivula pyrrhogularis*. Quadrados: *Ameivula sp. nov. 1*. Círculos abertos: *Ameivula sp. nov. 2*.

Quando comparados todos os compostos identificados apenas nos machos que apresentaram grande quantidade de ácidos graxos em suas secreções, o resultado da PERMANOVA revelou diferenças significativas entre as três espécies (PERMANOVA: $pseudo F_{2,33} = 2,26$ e $p = 0,001$) em relação à proporção dos compostos lipídicos. A análise de CAP, com base nas distâncias euclidianas, classificou corretamente 88,88% dos machos (teste permutacional, $\delta_1^2 = 0,97$ e $p = 0,004$). Um macho de *Ameivula sp. nov. 2* foi classificado como *Ameivula sp. nov. 1* e três machos de *A. pyrrhogularis* foram classificados como *Ameivula sp. nov. 1*. Os doze componentes principais explicaram 81,59% da variação entre as três espécies (**Figura 13**). O PC1 foi responsável por 19,85% da variação e teve correlação significativa e positiva com o 4-Decenal. O PC2 representou 13,3% da variação e correlação significativa e negativa com os ácidos tetradecanóico e pentadecanóico e positiva com o éster metílico do ácido octadecanóico e com o éster etílico do ácido 9-Octadecenóico. Com base nesses 12 PCs, a análise discriminante classificou corretamente 78,38% dos machos das três espécies de *Ameivula*. Dois machos de *Ameivula sp. nov. 2* e dois

machos de *A. pyrrhogularis* foram classificados como *Ameivula sp. nov. 1*. Um macho de *Ameivula sp. nov. 2* e dois machos de *Ameivula sp. nov. 1* foram classificados como *A. pyrrhogularis*. Um macho de *A. pyrrhogularis* foi classificado como *Ameivula sp. nov. 2*.

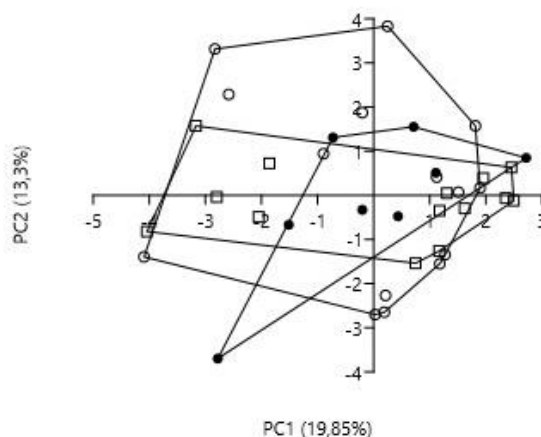


Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos adultos de três espécies de *Ameivula* que apresentaram significativas quantidades de ácidos graxos com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 38 compostos lipofílicos. Círculos fechados: *Ameivula pyrrhogularis*. Quadrados: *Ameivula sp. nov. 1*. Círculos abertos: *Ameivula sp. nov. 2*.

Quando comparados os machos que não apresentaram quantidades significativas de ácidos graxos em sua composição, o resultado da PERMANOVA revelou diferenças significativas entre as três espécies (PERMANOVA: $pseudo F_{2,33} = 2,91$ e $p = 0,001$) em relação à proporção dos compostos lipídicos. A análise de CAP, com base nas distâncias euclidianas, classificou corretamente 96,15% dos machos (teste permutacional, $\delta_1^2 = 0,98$ e $p = 0,001$) com apenas um macho de *A. pyrrhogularis* sendo classificado como *Ameivula sp. nov. 1*. Os seis primeiros componentes principais explicaram 81,56% da variação interespecífica (**Figura 14**). O PC1 explicou 34,39% dessa variação e apresentou correlação significativa e positiva com o hexanol e o 9-Octadecenal. O PC2 apresentou correlação positiva com o hexadecanal, o ácido 9-Hexadecenóico e o metil éster do ácido 9,12-Octadecadienóico. Com base nos *scores* da PCA a discriminante classificou corretamente 96% dos machos, com apenas um macho de *A. pyrrhogularis* sendo classificado como *Ameivula sp. nov. 1*.

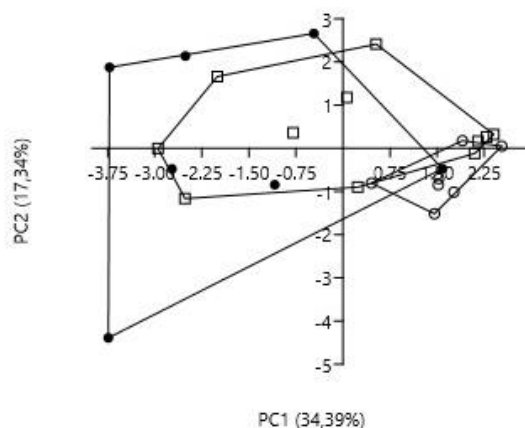


Figura 14. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação dos machos adultos de três espécies de *Ameivula* que não apresentaram significativas quantidades de ácidos graxos em suas secreções femorais com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de 18 compostos lipofílicos. Círculos fechados: *Ameivula pyrrhogularis*. Quadrados: *Ameivula sp. nov. 1*. Círculos abertos: *Ameivula sp. nov. 2*.

Padrão proteico

No total foram identificadas 11 bandas proteicas em machos das três espécies de *Ameivula*, variando entre 6 KDa e 30 KDa (**Figura 15**). Nas três espécies é possível observar que há material proteico com mais de 38 KDa, porém apresentam baixa intensidade e não é possível identificá-los com bandas bem delimitadas. Embora cada espécie pareça ter um padrão próprio de bandas proteicas, a existência de variação individual dificulta a identificação da espécie quando os indivíduos são observados de forma isolada. *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2* apresentaram bandas com intensidade visivelmente maior do que as observadas em *Ameivula sp. nov. 1*, principalmente em relação as bandas entre 21 KDa e 27 KDa. Nos nove indivíduo de *A. pyrrhogularis* foram identificadas oito bandas proteicas, duas em todos os indivíduos (16 KDa e 27 KDa) e três em oito indivíduos (6 KDa, 8KDa e 21 KDa). Oito bandas de proteínas foram identificadas nos nove machos de *Ameivula sp. nov. 1*, sendo que as bandas de 16 KDa e 21 KDa foram identificadas em todos os indivíduos e as demais apresentaram maior variação interindividual (**Figura 15**). Em *Ameivula sp. nov. 2* foram identificadas sete bandas proteicas, apenas a banda de 25 KDa foi identificada em todos os machos.

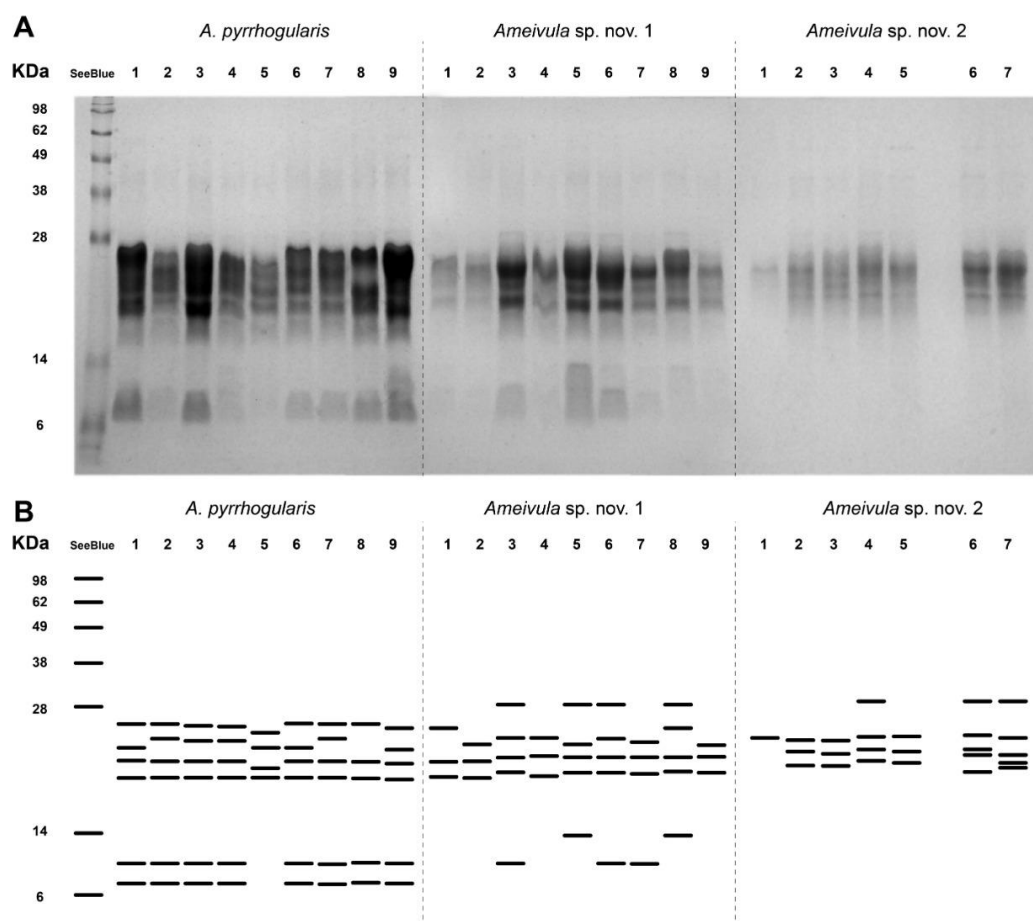


Figura 15. Padrão de bandas proteicas de machos adultos de *Ameivula pyrrhogularis*, *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* e marcador de peso molecular SeeBlue. **(A)** Imagem original da eletroforese em gel SDS-PAGE em coloração com ComassieBlue e **(B)** mapa indicando as bandas observadas no gel.

Com exceção de um indivíduo, machos de *Ameivula pyrrhogularis* apresentaram uma banda de 6 KDa que não foi identificada nas outras duas espécies. Dois machos de *Ameivula sp. nov. 1* apresentaram uma banda proteica de 10 KDa que não foi identificada em *A. pyrrhogularis* ou *Ameivula sp. nov. 2*. Um único macho de *Ameivula sp. nov. 2* apresentou uma banda (15 KDa) que não foi identificada nas outras duas espécies. *Ameivula pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 1* somaram 10 bandas de proteínas, sendo cinco compartilhadas pelos machos das duas espécies. As bandas de 16 KDa e 21 KDa foram identificadas em todos os indivíduos e as bandas de 8 KDa e 27 KDa não foram identificadas em *Ameivula sp. nov. 2*, mas apresentaram variação interindividual em *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 1*. Das 10 bandas proteicas identificadas em *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2* as quatro bandas compartilhadas por mais indivíduos das duas espécies, são as mesmas quatro compartilhadas pelas três espécies e a banda de 18 KDa foi exclusiva das duas espécies,

porém identificada em apenas um macho de *A. pyrrhogularis* e dois machos de *Ameivula sp. nov. 2*. Oito bandas foram identificadas em *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2*, nenhuma compartilhadas por todos os indivíduos. A banda de 30 KDa foi identificada apenas em machos das duas espécies. O fenograma criado pela análise de UPGMA, gerado apenas para visualização da matriz de similaridade das bandas de proteínas, mostra que, com exceção de um indivíduo, machos de *A. pyrrhogularis* encontram-se bem agrupados, há dois agrupamentos mostrando grande similaridade entre o padrão de proteínas de machos de *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* e há três machos de *Ameivula sp. nov. 2* que formaram um grupo que apresentou menor similaridades com os outros indivíduos das três espécies (**Figura 16**).

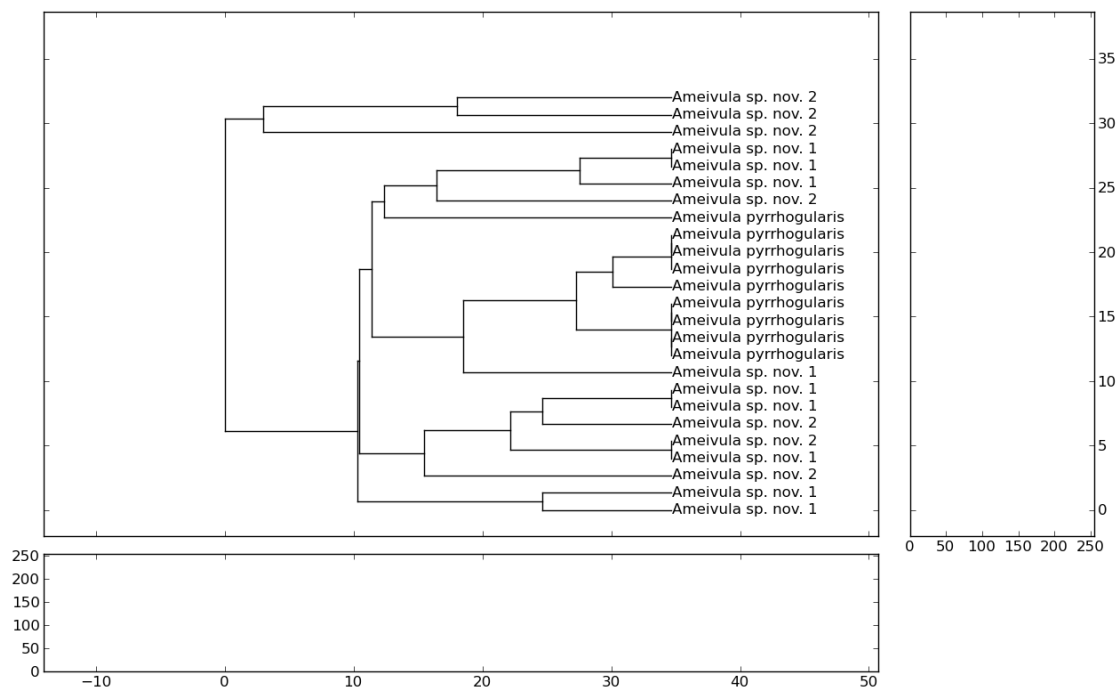


Figura 16. Fenograma gerado pela análise de UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) com base na matriz de similaridade do padrão individual de bandas de proteínas de machos de *Ameivula pyrrhogularis*, *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2*.

Discussão

Em muitas espécies de Squamata apenas machos apresentam glândulas femorais/pré-anais e em muitas outras, apenas machos produzem quantidade significativa de secreção durante a estação reprodutiva (ALBERTS, 1993). Entre as espécies de Teiidae, o padrão mais frequente é que machos e fêmeas apresentem poros

(HARVEY *et al.*, 2012). *Ameiva ameiva* não apresenta dimorfismo sexual em relação ao número ou diâmetro dos poros femorais (IMPARATO *et al.*, 2007), em *Salvator merianae* fêmeas de cativeiro não apresentaram cilindro de secreção (CHAMUT *et al.*, 2009) e, até onde pudemos confirmar, não há dados sobre a morfologia das glândulas femorais de espécies de *Ameivula*. O número de poros femorais das fêmeas das espécies estudadas é similar ao dos machos de sua respectiva espécie, porém a quantidade de secreção que obtivemos de fêmeas de *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2* foi bastante inferior a observada na maioria dos machos. Todas as fêmeas de *Ameivula sp. nov. 2* e *A. pyrrhogularis* das quais foram obtidas secreções estavam sexualmente ativas (presença de ovos, folículos vitelogênicos e/ou ovidutos desenvolvidos), mas apenas duas fêmeas de *A. pyrrhogularis* apresentaram uma mistura complexa de compostos. Excluindo essas duas fêmeas, foram identificados apenas 12 compostos lipofílicos em *A. pyrrhogularis* e 17 em *Ameivula sp. nov. 2*. O baixo número de compostos identificados na maioria das fêmeas de *Ameivula* parece não ser um evento biológico real, mas sim consequência da baixa quantidade de material que impossibilitou a realização de uma extração de boa qualidade dos compostos presentes nas secreções. A quantidade de cada composto é dada pela porcentagem relativa de um dado composto em relação à corrente total de íons (WILSON & WALKER, 2010) e pode sofrer influência, mais ou menos significativa, do número total de compostos identificados. Como em sete fêmeas foram identificados menos de 15 compostos lipídicos, as demais discussões serão realizadas apenas com os resultados das duas fêmeas de *A. pyrrhogularis* que apresentaram mais de 25 compostos.

Nas duas fêmeas de *A. pyrrhogularis* foram identificados 37 compostos lipofílicos, enquanto os machos somaram 72 compostos. Essas duas fêmeas apresentaram 25 e 32 compostos e onze, dos quinze, machos apresentaram mais de 33 compostos. A literatura a respeito da composição das secreções femorais e pré-anais de fêmeas de lagartos é escassa e não temos conhecimento sobre o papel das secreções em fêmeas (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b). Em *Blanus cinereus* (Amphisbaena) (LÓPEZ & MARTÍN, 2005b), *Liolaemus wiegmannii* (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b) e *Acanthodactylus boskianus* (Lacertidae) (KHANNOON *et al.*, 2011a), fêmeas apresentaram uma mistura complexa de compostos lipídicos e diferenças qualitativas e quantitativas comparadas à secreção dos machos. As duas fêmeas de *A. pyrrhogularis* apresentaram quatro compostos não identificados em machos, enquanto nos machos

foram identificados 39 compostos exclusivos. A menor diversidade de compostos e quantidade de secreção em fêmeas de *A. pyrrhogularis* podem ser um indicativo de que a sinalização química tem menor importância para as fêmeas do que para os machos, tanto pela menor possibilidade de secretar informações mais complexas, com maior número de compostos diferentes, quanto pela menor quantidade de secreção disponível (CHAMUT *et al.*, 2009; BECKER *et al.*, 2012; BAECKENS *et al.*, 2015 e 2017). O papel funcional das secreções femorais de fêmeas de *Ameivula* precisa ser testado e o aumento de amostras possibilitará uma melhor caracterização química dessa fonte de semioquímicos, porém nossos resultados deixam evidente a produção de secreção de glândulas femorais por fêmeas e que sua composição é complexa o suficiente para ser utilizada em diferentes contextos sociais.

Machos de *A. pyrrhogularis* apresentaram maior número de poros femorais totais do que os machos das outras duas espécies, que não apresentaram diferença entre si. Em Lacertidae o número de poros femorais apresenta relação com o tipo de substrato utilizado por cada espécie, mas não apresenta relação com as condições climáticas (BAECKENS *et al.*, 2015). As três espécies de *Ameivula* estudadas neste capítulo habitam solos arenosos na Caatinga, permitindo assim excluir a hipótese de que o maior número de poros femorais em *A. pyrrhogularis* possa estar relacionado ao tipo de substrato utilizado por esses lagartos. Em espécies de *Liolaemus* inicialmente foi identificada uma relação do número de poros com características climáticas, indicando que o maior número de poros estaria associado com maior produção de secreção em locais com condições desfavoráveis para a durabilidade dos sinais no meio (ESCOBAR *et al.*, 2001). Um segundo estudo, com maior número de espécies e que levou em consideração as relações filogenéticas entre as espécies de *Liolaemus*, falhou em observar essa relação entre condições climáticas e números de poros, indicando que as relações filogenéticas explicariam a variação do número de poros no gênero (PINCHEIRA-DONOSO *et al.*, 2008). Os dados genéticos disponíveis indicam baixa diversidade genética entre as linhagens de *Ameivula* na Caatinga (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Dados preliminares obtidos por ARIAS e RECODER, indicam que *A. pyrrhogularis* é irmã de *Ameivula sp. nov. 1* e este clado irmão de *Ameivula sp. nov. 2*, contudo, há conflito entre as relações filogenéticas recuperadas com base em dados de DNA mitocondrial e nuclear. Além da proximidade filogenética entre as três espécies, quando observamos a variação anual de temperatura e umidade entre as três localidades,

notamos que a média da temperatura é basicamente a mesma e o Parque Nacional da Serra da Capivara apresenta precipitação máxima sutilmente superior. As condições ambientais não explicam a variação no número de poros das três espécies de *Ameivula* e a proximidade filogenética entre as três espécies indica que a história evolutiva também não explica o maior número de poros em *A. pyrrhogularis*. BAECKENS e colaboradores (2015) deixam em aberto a hipótese de que a variação do número de poros femorais pode também indicar a intensidade da seleção sexual. Embora *A. pyrrhogularis* apresente um marcado dimorfismo sexual em coloração, nos faltam informações sobre a ecologia das três espécies para que possamos avaliar se essa é uma explicação possível para o maior número de poros femorais em *A. pyrrhogularis*.

Todos os machos das três espécies apresentaram colesterol em suas secreções, sendo um dos quatro compostos mais abundantes em 56 machos (62 no total) e não apresentando diferenças estatísticas entre as espécies. A ausência de colesterol foi uma característica de destaque na secreção femoral de machos de *S. merianae* de cativeiro (MARTÍN *et al.*, 2011), mas neste trabalho o colesterol foi identificado em todas as espécies de Teiidae estudadas. A principal função do colesterol é a de atuar como uma matriz não reativa para proteger os verdadeiros semioquímicos e mais recentemente foram identificadas outras funções (em detalhes no CAPÍTULO 2) como, por exemplo, agressividade e capacidade de luta de machos (MARTÍN & LÓPEZ, 2007; KHANNOON *et al.*, 2011b) e sinalização da idade (LÓPEZ & MARTÍN, 2005a). A ausência do colesterol em *S. merianae* foi justificada pela morfologia dos plugues de secreção dos machos, que apresenta significativa quantidade de queratina, além de camadas epiteliais (CHAMUT *et al.*, 2009), que poderiam estar substituindo o colesterol na função de proteger os semioquímicos (MARTÍN *et al.*, 2011). Até onde pudemos confirmar, não há dados na literatura sobre a morfologia dos cilindros de secreção para espécies de *Ameivula*, ou mesmo de *Cnemidophorus*, mas se a morfologia apresentar similaridades com *A. ameiva* (IMPARATO *et al.*, 2007) e *S. merianae* (CHAMUT *et al.*, 2009) é possível que apresentem camadas epiteliais que protegeriam os semioquímicos, indicando que o colesterol em *Ameivula*, assim como em outras espécies de Teiidae, apresenta outras funções relacionadas a contextos sociais. É pouco provável que o colesterol esteja sinalizando habilidade de luta em machos adultos de *Ameivula*, uma vez que não há correlação entre o tamanho corporal e a quantidade de colesterol identificada nas três espécies, mas amostras de machos jovens são necessárias para

avaliar se este esteroide tem correlação com a idade. Pela ausência de diferenças interespecíficas, o colesterol pode estar desempenhando funções sociais similares nas três espécies de *Ameivula*.

Os ácidos graxos representaram grande porcentagem da secreção femoral da maioria dos machos das três espécies de *Ameivula*. Em relação a soma de todos os ácidos graxos identificados, *Ameivula sp. nov. 2* apresentou maiores quantidades, *A. pyrrhogularis* menores quantidades e *Ameivula sp. nov. 1* apresentou porcentagem de ácidos graxos que não diferiu estatisticamente das outras duas espécies. Ácidos graxos são compostos odoríferos suscetíveis à evaporação, especialmente os insaturados e/ou com cadeias carbônicas com 16 carbonos ou menos (ALBERTS *et al.*, 1992a; BAECKENS *et al.*, 2017). Em ambientes com temperatura elevada e baixa umidade, como é o caso da Caatinga, os ácidos graxos estão suscetíveis a taxas de evaporação mais rápidas, reduzindo a duração das marcações no substrato (ALBERTS, 1992). Inicialmente a quantidade de ácidos graxos presentes nas secreções femorais dos machos das três espécies de *Ameivula* pode parecer contra intuitiva, porém essa parece ser uma característica comum entre os Teiidae (MARTÍN *et al.*, 2011; demais capítulos desta tese), mesmo em indivíduos de *A. ameiva* da mesma localidade de *A. pyrrhogularis*. Como discutido anteriormente, a própria morfologia dos plugues de secreção pode conferir maior estabilidade para as secreções e o colesterol, mesmo que esteja desempenhando outras funções, pode contribuir para a maior duração desses ácidos nas marcações.

Outro aspecto que deve ser considerado neste contexto é a variação na quantidade de ácidos graxos encontrada entre indivíduos da mesma espécie. Os trabalhos que buscaram caracterizar as secreções femorais de lagartos coletam as secreções durante a estação reprodutiva por este período corresponder ao aumento da produção de secreção na maioria das espécies e há poucos dados comparativos entre a composição química das secreções dentro e fora da estação reprodutiva. Em *Iguana iguana* não foi observada variação significativa na quantidade total de ácidos graxos entre os dois períodos, mas há aumento de ácidos graxos insaturados e/ou de menor cadeia carbônica durante a estação reprodutiva (ALBERTS *et al.*, 1992). Esse aumento de compostos mais voláteis pode aumentar a detectabilidade das secreções durante a estação reprodutiva quando se presume que tenham maior importância (ALBERTS *et al.*, 1992). Todos os machos de

Ameivula coletados apresentaram CRC compatível com o da maturidade sexual e testículos e ductos deferentes opacos e enovelados, porém o ciclo reprodutivo de lagartos neotropicais pode ser mais complicado, com animais adultos apresentando diferentes condições reprodutivas em um mesmo período e em uma mesma localidade (NISA *et al.*, 2017). Não foram realizados cortes histológicos para confirmar que todos os machos estavam produzindo espermatozoides no momento em que foram amostrados, mas a variação significativa nesses compostos voláteis nos permite pensar na possibilidade de que machos que estejam reprodutivamente ativos podem estar secretando grandes quantidades de ácidos graxos, mesmo em uma clima quente e seco, aumentando assim a detectabilidade de suas marcações durante a estação reprodutiva.

Embora tenham apresentado variação interindividual, os ácidos mais abundantes foram, respectivamente, o palmítico, o oleico, o esteárico e linoleico (ácido 9,12-Octadecadienóico) e não apresentaram diferenças estatísticas entre as três espécies. Nenhum desses ácidos apresentou correlação com o tamanho corporal dos indivíduos, embora seja possível observar uma leve tendência de machos maiores apresentarem maiores quantidades do ácido palmítico. O ácido esteárico nunca foi o mais abundante entre os ácidos graxos identificados, ao contrário do observado para *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011; CAPÍTULO 2) e em alguns indivíduos de *A. ameiva* (CAPÍTULO 1). Entre os ácidos graxos mais abundantes, o esteárico seria o mais estável nas condições ambientais da Caatinga por ser saturado e com maior cadeia carbônica (ALBERTS, 1992; ALBERTS *et al.*, 1992a). Sua função nas espécies de *Ameivula* precisa ser testada no futuro para entendermos as diferenças entre diferentes gêneros de Teiidae. O ácido linoleico é considerado essencial para o metabolismo e precisa ser ingerido diretamente na dieta (BURR *et al.*, 1930). Sua importância para o metabolismo e sua origem da dieta, torna este ácido um potencial candidato para sinalizar de forma honesta a qualidade do macho, uma vez que apenas machos com boa alimentação e saudáveis seriam capazes de secretá-lo em maiores quantidades (MARTÍN *et al.*, 2011). Essa é uma possibilidade a ser testada, uma vez que poucos machos de *Ameivula* apresentaram-no em quantidades maiores. O ácido palmítico é bastante abundante em diferentes espécies de lagartos (WELDON *et al.*, 2008) e está relacionado com piores qualidades de saúde em *Podarcis muralis* (MARTÍN *et al.*, 2008), mas indica melhor simetria e menores níveis de estresse em *Iberolacerta cyreni*

(ARAGÓN *et al.*, 2008). Não temos informações suficientes para criarmos hipóteses consistentes sobre a potencial função do ácido palmítico nas três espécies de *Ameivula*.

Em *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* há grandes quantidades de esqualeno e α -tocoferol (vitamina E) em alguns indivíduos. É bastante curiosa a elevada quantidade desses dois compostos lipídicos na secreção das duas espécies que estão em localidades secas, uma vez que a principal função desses dois compostos em secreções femorais de lagartos é a de atuarem como antioxidantes em locais de maior umidade (ALBERTS, 1992; GABIROT *et al.*, 2008; WELDON *et al.*, 2008). Em algumas espécies de anfisbenas e serpentes, o esqualeno está associado com o reconhecimento sexual e com o *status* de dominância dos machos (WELDON *et al.*, 2008; LÓPEZ & MARTÍN, 2009), por outro lado, em *L. wiegmannii* as fêmeas apresentam maiores quantidades deste composto (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b). Nas espécies de *Ameivula* o esqualeno não deve estar associado com a identificação sexual, pois foi identificado em todas as fêmeas e há machos que apresentaram quantidades baixíssimas, enquanto outros apresentaram mais de 20%. Além das diferentes funções já identificadas, machos e fêmeas de *Uromastix aegyptia* (Agamidae), uma espécie de clima árido, apresenta quantidade significativa de esqualeno (TIC > 4%) e os autores explicam esse padrão com base no comportamento da espécie, que passa períodos em túneis e tocas nos quais a função antioxidante do esqualeno seria importante (MARTÍN *et al.*, 2016b). Em *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* o esqualeno está associado a baixas quantidades do ácido oleico, que é utilizado por fêmeas na seleção de machos em *I. cyreni*, com machos com maiores quantidades do ácido oleico sendo mais atrativos para as fêmeas (MARTÍN & LÓPEZ, 2010b). É possível que esses dois compostos estejam desempenhando diferentes papéis em diferentes momentos do ciclo reprodutivo das três espécies de *Ameivula* no caso em que fêmeas apresentem preferência por maior quantidade do ácido oleico e, assim como outras espécies de Teiidae, busquem abrigos em tocas subterrâneas. O esqualeno pode aumentar a estabilidade das secreções nas tocas, enquanto o ácido oleico, está aumentando a detectabilidade da secreção enquanto os animais estão ativamente marcando o território e buscando por parceiras durante a estação reprodutiva.

O papel das secreções femorais no isolamento reprodutivo tem sido estudado para algumas espécies/linhagens de lagartos. Em *Lacerta vivipara*, embora machos de linhagens ovíparas e vivíparas apresentem diferenças estatísticas em relação ao padrão

de compostos lipofílicos presentes em sua secreção, a “hibridização” entre essas duas linhagens ainda ocorre entre animais em laboratório (GABIROT *et al.*, 2008). Machos de *P. hispanica* de diferentes linhagens oriundas de climáticas distintas e diferindo na composição química das secreções, dardejaram mais para indivíduos da própria localidade (GABIROT *et al.*, 2012). Estes dados sugerem a ocorrência de cruzamentos preferenciais dentro da própria linhagem e podem, segundo autores, estar associados a um processo de especiação críptica. Um segundo trabalho com *P. hispanica* falhou em encontrar preferência das fêmeas por machos de sua própria população (GABIROT *et al.*, 2013). A preferência das fêmeas de *P. hispanica* parece estar mais associada a características químicas que apresentaram grande variação entre indivíduos do que aquelas que apresentaram variações entre localidades. O mesmo foi observado em fêmeas de *Psammodromus algirus* (Lacertidae), que não demonstraram preferência por machos de sua própria linhagem, ainda que diferenças na composição tenham sido observadas. Para as fêmeas de *P. algirus* os autores apresentaram a hipótese de que fêmeas podem não ser capazes de detectar diferenças sutis na quantidade de determinados compostos e/ou que não são capazes de detectar compostos que variaram de forma qualitativa, porém que foram encontradas em quantidades muito pequenas (MARTÍN *et al.*, 2016a). Os autores notaram que, embora não haja preferência por parte das fêmeas, os machos de *P. algirus* são mais agressivos quando apresentados a secreção de machos da outra linhagem e esse aspecto pode reduzir as chances de machos encontrarem e copularem com fêmeas da outra linhagem (MARTÍN *et al.*, 2016a).

Nossos resultados indicam que a composição química da secreção é um preditor da identificação das espécies de *Ameivula*, embora nem todos os indivíduos amostrados possam ser perfeitamente classificados. Em relação aos componentes proteicos, a discriminação é menos eficiente, há maior similaridade entre os machos de *A. pyrrhogularis*, mas a separação entre os indivíduos de *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* é pouco clara. Os componentes lipofílicos quando observados em sua totalidade, permitem classificar corretamente aproximadamente 92% dos indivíduos. Comparando apenas os compostos lipídicos compartilhados pelo maior número de machos das três espécies, esse valor é inferior quando comparados apenas machos com grande quantidade de ácidos graxos (aproximadamente 78%) e superior quando comparamos machos sem grande quantidade de ácidos (aproximadamente 96%). Se,

como discutimos anteriormente, o aumento da quantidade de ácidos graxos estiver vinculado ao aumento da detectabilidade das informações químicas em animais reprodutivamente ativos, é possível que, uma vez em contato, haja cruzamentos entre machos e fêmeas das diferentes espécies de *Ameivula*. Esse padrão pode ser acentuado se essas espécies já estiveram em contato em sua história evolutiva recente e utilizaram as informações químicas em interações interespecíficas (GABIROT *et al.*, 2008) e este parece ser o caso das três espécies de *Ameivula* estudadas neste capítulo. Os dados moleculares disponíveis até o momento indicam baixa diversidade molecular entre as diferentes espécies reconhecidas na Caatinga (OLIVEIRA *et al.*, 2015) e as novas informações que estão sendo produzidas revelam, não apenas a proximidade filogenética entre as três espécies de *Ameivula*, como também a possibilidade de que *Ameivula sp. nov. 1* seja um híbrido formado por *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2* (ARIAS e RECODER em comunicação pessoal). Mais ainda, grande parte da literatura comparando populações de uma mesma espécie, envolveu populações de áreas com condições climáticas distintas, principalmente no que se refere à temperatura e umidade. As três espécies de *Ameivula* estudadas vivem sob condições climáticas muito similares, inclusive no que diz respeito ao tipo de substrato, e, assim como ocorre para aspectos da biologia reprodutiva de outros lagartos (NISA *et al.*, 2017), as condições climáticas da Caatinga podem atuar como uma forte pressão seletiva que atua na manutenção de similaridades entre diferentes espécies.

Alterações no número de dardejadas têm sido a principal ferramenta metodológica para acessar a capacidade de discriminação química em Squamata (COOPER JR. & BURGHARDT, 1990; BARBOSA *et al.*, 2006). A ausência de diferenças estatísticas no número de dardejadas têm sido interpretadas como a incapacidade de diferenciar dois estímulos químicos, porém essa interpretação não está necessariamente correta (COOPER, 1998). Levando em consideração a especificidade do órgão vomeronasal na detecção de compostos químicos e seu nível de desenvolvimento em Squamata (KARDONG, 2008), somados as inúmeras evidências de que poucas dardejadas são suficientes para se obter as informações necessárias (MASON, 1993; SHINE *et al.*, 2000 e 2003; BARBOSA *et al.*, 2006), é mais provável que em alguns contextos essas diferenças estejam relacionadas a diferentes preferências dos indivíduos frente a diferentes estímulos químicos. Fêmeas das três espécies, assim como machos de *Ameivula sp. nov. 2* e de *A. pyrrhogularis*, não apresentaram maior

interesse pela secreção femoral de machos da sua própria espécie. Levando em consideração que utilizamos quantidades de material muito superiores as que os animais encontram naturalmente em marcações no substrato, é pouco provável que esses indivíduos não estivessem detectando e reconhecendo as informações químicas apresentadas. Assim como em *P. algirus* (NISA *et al.*, 2019) e *P. hispanica* (GABIROT *et al.*, 2012), a ausência de diferenças indica a não preferência das fêmeas das três espécies de *Ameivula* por machos da sua própria espécie. Esse padrão faz ainda mais sentido quando ressaltamos que o experimento foi realizado em março de 2019, mês no qual basicamente todos os machos das três espécies apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos (menor porcentagem de acerto de identificação das espécies nas análises estatísticas).

Machos de *Ameivula sp. nov. 1* demonstraram, não apenas maior interesse para as secreções femorais de machos da própria espécie, como maior agressividade às secreções de machos de *A. pyrrhogularis* e *Ameivula sp. nov. 2*. Esse padrão é similar ao observado em machos de *P. algirus* (MARTÍN *et al.*, 2016a) e pode explicar o distanciamento geográfico entre as três espécies, assim como o isolamento reprodutivo de *Ameivula sp. nov. 1*. Caso se confirme que *Ameivula sp. nov. 1* é um híbrido das outras duas espécies, podemos imaginar um cenário no qual *Ameivula sp. nov. 2* e *A. pyrrhogularis* ocorriam em simpatria e cruzamentos entre as duas espécies aconteciam. O surgimento do híbrido, que apresenta maior tamanho corporal e maior agressividade, poderia, ao longo de gerações, afastar as duas linhagens parentais. O mesmo poderia ter ocorrido sem a origem híbrida de *Ameivula sp. nov. 1*, porém tendo como pressuposto um período de parapatría entre essas espécies ou, ao menos, entre *Ameivula sp. nov. 1* e as outras duas espécies em extremidades opostas da sua área de distribuição.

Conclusões

- Fêmeas de *Ameivula pyrrhogularis* indicaram que fêmeas podem apresentar padrão químico complexo e diferenças qualitativas com as secreções femorais de machos.

- Machos de *A. pyrrhogularis* apresentaram maior número de poros femorais. Essa diferença não pode ser explicada pelas relações filogenéticas e por condições climáticas, mas pode estar associada com a intensidade da seleção sexual na espécie.
- Colesterol foi identificado em todos os machos de *Ameivula*, assim como em outros Teiidae, este esteroide não parece ter como principal função a de matriz não reativa dos verdadeiros semioquímicos. A função exata do colesterol ainda precisa ser testada, mas potencialmente pode ser a mesma nas três espécies.
- Ácidos graxos foram especialmente abundantes na maioria dos machos de *Ameivula*. Esses compostos são bastante voláteis, especialmente em condições climáticas como as da Caatinga. A morfologia dos plugues de secreção pode conferir maior estabilidade para esses compostos. Outra hipótese a ser testada é a associação desses ácidos com o *status* reprodutivo dos machos, que poderiam aumentar a detectabilidade de suas marcações durante o período reprodutivo.
- A secreção femoral de *Ameivula sp. nov. 1* e *Ameivula sp. nov. 2* apresenta grande quantidade de esqualeno que apresenta relação inversamente proporcional o ácido oleico. Esses dois compostos podem ser utilizados em contextos distintos, o esqualeno aumentando a durabilidade da secreção nas tocas e o ácido oleico aumentando a detectabilidade das marcações durante a estação reprodutiva.
- A composição química da secreção femoral parece ser um bom preditor da espécie, porém a porcentagem de erro é maior quando analisados apenas nos machos que apresentaram grande quantidade de ácidos graxos. Se os ácidos graxos forem secretados em maior quantidade durante a estação reprodutiva, esse padrão pode permitir a ocorrência de cruzamentos interespecíficos caso as espécies entrem em contato.
- O experimento comportamental, em convergência com os dados de composição química das secreções, demonstrou que as fêmeas não apresentam preferência (ou maior interesse) pela secreção dos machos da própria espécie e apenas os machos de *Ameivula sp. nov. 1* apresentaram maior interesse por secreções da própria espécie e maior agressividade para com machos das outras duas espécies.

Apêndice

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todos os machos de *Ameivula pyrrhogularis*. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC %). ♂1 – MTR39582, CRC = 6,9 cm; ♂2 – MTR39635, CRC = 7,13 cm; ♂3 – MTR39626, CRC = 7,32 cm; ♂4 – MTR39634, CRC = 7,37 cm; ♂5 – MTR39625, CRC = 8,48 cm; ♂6 – MTR39646, CRC = 9,07 cm; ♂7 – MTR39624; CRC = 9,21 cm; ♂8 – MTR39644, CRC = 7,49 cm; ♂9 – MTR39579, CRC = 7,53 cm; ♂10 – MTR39528, CRC = 8,88 cm; ♂11 – MTR39645, CRC = 9,33 cm; ♂12 – CRC = 8,1 cm; ♂13 – CRC = 9 cm; ♂14 – CRC = 10 cm e ♂15 – CRC = 10,1 cm.

Compostos	PADRÃO 1							TIC (%)							
	2017							PADRÃO 2				2019			
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♂6	♂7	♂8	♂9	♂10	♂11	♂12	♂13	♂14	♂15
Hexanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	-	0,31	-
Hexanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,26	0,6	0,24	0,47	0,19
2-Nonenal	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Decenal	-	-	0,04	0,03	0,11	-	0,01	0,02	0,02	-	-	-	-	-	-
4-Dodecanona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14
Dodecanal	-	-	-	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dodecanol	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,15	-	-	-	-	-	-
Ácido Tridecanóico	-	0,07	-	0,38	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Pentadecanal	-	0,26	-	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Tetradecanóico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,92	0,92	0,51	0,68	1,44
Hexadecanal	0,34	-	0,3	0,53	0,41	0,27	0,42	0,04	0,32	-	0,25	0,5	0,65	0,6	0,46
Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	-	-	-	0,28	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Pentadecanóico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,46	0,49	-	-	0,26
Hexadecanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,11	0,2	0,3

2-Heptadecanona	-	-	-	0,47	-	-	-	-	-	-	-	-	0,72	-	1,29
Heptadecanal	0,14	0,42	-	-	0,12	0,08	0,2	0	0	-	-	-	-	-	-
Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,18	-	0,1	-	0,3	0,13	0,5	0,1	0,5	-	-	0,45	0,15	-	0,17
Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,86	-	0,92	1,37
Ácido Hexadecanóico	-	-	-	-	-	3,16	-	17,02	5,14	7,74	37,53	11,91	7,72	10,72	13,4
Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	0,05	-	0,03	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	2	1,79	1,74	2,08	2,24	2,3	2,3	1,32	4,06	-	-	0,99	0,55	0,85	0,33
9-Octadecenal	-	-	-	-	0,17	0,19	-	-	-	-	-	0,67	0,31	0,93	0,21
Octadecanal	1,9	2,34	0,68	1,64	1,64	0,94	1,49	-	1,82	-	0,41	0,37	0,73	0,47	0,28
Ácido Heptadecanóico	-	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-	0,47	0,15	-	0,35	0,3
Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,18	-	0,13	1,15	0,33	0,23	0,41	0,11	-	-	-	0,18	-	0,14	-
Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,24	-	0,24	0	0,44	0,26	0,55	0,18	0,57	-	-	0,35	-	-	-
Metil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	0,14	1,19	-	0,08	0,43	0,08	-	-	-	0,24	0,07	-	-
Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-	4,53	8,07	2,46	2,04	1,69	3,85
Ácido 9-Octadecenóico	-	-	-	-	-	0,49	-	16,39	0,61	14,27	11,99	2,55	3,75	5,63	4,4
Ácido graxo não identificado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,12	-	-	2,81
Ácido Octadecanóico	-	-	-	-	-	-	-	4,75	-	8,48	15,64	2,12	4,11	5,03	7,37
Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	1,47	1,22	0,95	1,51	1,66	1,64	1,47	2	2,47	-	-	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	2,46	1,73	1,72	1,83	2,26	1,98	1,81	1,1	3,1	-	-	-	-	-	-
Hexadecanamida	-	-	-	-	0,81	0,1	0,21	0,7	0,3	5,52	0,47	0,79	0,93	-	1,2
Etil Éster do Ácido Octadecanóico	1,08	1,52	0,83	1,4	1,6	1,01	0,97	0,58	1,31	-	-	0,7	0,41	0,65	0,81
2-Pentacosanona	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eicosanal	0,09	0,17	0,1	-	0,22	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eicosanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06	-	0,17
Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,49	-	0,07	-	2,34	0,25	0,84	0,16	0,35	1,12	-	-	-	-	-
Cetona não identificada	-	-	0	-	0	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	1,03	0,61	0,12	-	1,19	-	0,31	-	0,19	-	-	-	-	-	-

Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	-	2,39	-	-	0,2	0,48	-	0,61	-	5,55	-	6,35	6,03	3,95	5,14
Derivado do γ -Sitosterol	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	0,91	0,8	0,41	0,62
Derivado do Stigmasterol	0,3	-	1,45	-	0,74	0,07	2,04	-	-	-	-	-	-	-	-
Derivado do Cholest-7-en-3-ol	-	-	-	0,33	-	1,29	1,9	-	-	-	-	5,3	4,71	4,22	4,8

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todos os machos de *Ameivula sp. nov. 1* coletados em março de 2017. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC %). ♂1 – MTR39659, CRC = 8,11 cm; ♂2 – MTR39658, CRC = 8,89 cm; ♂3 – MTR39552, CRC = 9,21 cm; ♂4 – MTR39651, CRC = 9,32 cm; ♂5 – MTR39540, CRC = 9,8 cm; ♂6 – MTR39657, CRC = 10,16 cm; ♂7 – MTR39656; CRC = 10,17 cm; ♂8 – MTR39539, CRC = 10,66 cm; ♂9 – MTR39654, CRC = 10,76 cm; ♂10 – MTR39655, CRC = 10,78 cm e ♂11 – MTR39650, CRC = 11,02 cm.

Compostos	TIC (%)										
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♂6	♂7	♂8	♂9	♂10	♂11
2-Nonenal	-	-	0,34	0,18	0,51	-	-	0,11	0,03	-	-
4-Decenal	-	-	0,24	0,07	0,5	0,1	-	0,06	0,23	-	0,13
Decanal	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-
Ácido Decanóico	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
Pentadecanal	-	0,89	-	-	-	0,1	0,38	0,23	0,04	-	-
Metil Éster do Ácido Tetradecanóico	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
Ácido Tetradecanóico	-	-	-	-	0,67	-	-	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido Tetradecanóico	-	-	0,04	-	-	-	0,45	-	0,13	-	0,31
Hexadecanal	0,63	0,65	1,47	0,46	0	2,05	0,9	0,86	1,08	-	0,67
Ácido Pentadecanóico	-	0,42	-	-	0,76	-	-	-	-	-	-
Aldeído não identificado	-	-	-	-	0,57	-	-	-	0,06	-	-
Etil Éster do Ácido Pentadecanóico	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
2-Heptadecanona	-	1	-	-	-	-	-	0,95	-	-	-
Heptadecanal	-	-	0,34	0,88	0,07	0,21	-	-	0,34	-	-

Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	-	-	0,83	0,34	0	0,29	-	0,45	0,67	-	1,69
Ácido Hexadecanóico	-	-	0	0,09	19,97	5,57	-	-	5,05	-	-
Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	-	-	-	-	-	-	0,64	-	-
Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	1,94	4,71	4,46	2,23	-	-	1,2	2,36	6,64	-	5
9-Octadecenal	-	-	0,41	-	-	2,53	-	-	0,84	-	-
Octadecanal	3,37	-	2,84	4,22	1	2,12	2,28	1,82	2,49	3,27	-
Ácido Heptadecanóico	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-
Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	0,36	0,25	-	0,19	-	-	0,53	-	-
Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	0,54	0,35	-	0,24	-	-	0,89	-	-
Metil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	-	0,17	-	-	-	-	0,34	-	-
Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-
Nonadecanal	-	-	0,18	0,13	-	0,1	-	-	0,19	-	-
Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	-	-	6,19	-	-	-	-	-	-
Ácido 9-Octadecenóico	-	-	-	-	25,94	-	-	-	0,21	-	-
Ácido Octadecanóico	-	-	-	-	8,6	0,54	-	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	1,57	2,37	2,5	2,92	-	0,83	1,02	2,15	3,95	0,66	3,13
Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	2,52	2,63	2,61	3,16	-	0,75	0,98	2,84	4,4	0,84	3,27
Hexadecanamida	-	-	-	-	6,73	0,14	-	-	0,11	-	0,81
Etil Éster do Ácido Octadecanóico	2,83	-	3,82	1,95	-	0,69	-	-	3,48	-	1,64
Aldeído não identificado	-	-	3,71	2,06	-	0,64	-	-	4,4	-	-
Eicosanal	0,68	0,48	0,36	0,25	-	-	-	-	0,3	-	-
9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	-	-	0,49	0,49	-	0,51	0,78	-	0,45	-	2,6
Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	-	-	1,66	-	-	-	-	-	-
Amida não identificada	-	-	-	-	3,98	-	-	-	-	-	-
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-
Cetona não identificada	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-	-
Metil Éster do Ácido 10,13-Eicosadienóico	0,39	-	-	-	-	-	-	-	0,51	-	-

Metil Éster do Ácido 11-Eicosenóico	0	-	-	-	-	-	-	-	0,48	-	-
Etil Éster do Ácido Eicosanóico	0	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-
9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	1,06	-	1,04	-	-	0,14	-	-	0,18	-	0,79
Octadecanoic acid, oxironylmethyl ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33
Derivado do Cholest-5-en-3-ol	2,09	-	2,04	-	0,42	0,66	1,29	-	0,49	1,37	0,86
13-Docosenamida	8,12	20,14	1,23	2,17	0,64	1,67	30,2	12,92	1,52	3,45	7,03
Esqualeno	3,25	15,23	1,54	1,3	1,32	0,78	10,13	32,69	1,2	2,53	7,3
Cholesta-2,4-diene	-	-	-	0,31	-	-	-	-	0,08	-	0,65
Derivado do Cholesta-2,4-diene	2,97	1,78	3,09	2,84	0,58	0,69	1,07	1,34	0,46	1,53	2,83
Cholesta-4,6-dien-3-ol	4,18	-	1,94	2,34	0,99	1,47	0,78	-	0,67	1,19	-
Cholesta-3,5-diene	9,7	4,24	9,14	10,79	1,3	2,5	3,48	2,97	2	4,33	-
Ergosta-4,6,22-triene	1,22	-	1,74	0,14	0,6	0,12	1,63	-	0,17	-	-
Derivado do Ergost-5-en-3-ol	6,58	1,06	4,07	4,8	1,83	0,93	1,42	0,9	1,45	1,59	0,66
Anthiaergosta-5,7,9,14-tetraene	1,76	1,41	0,61	1,05	-	1,34	1,14	0,47	0,15	2,05	-
Stigmasta-3,5-diene	-	-	-	-	0,86	-	-	2,61	-	-	-
γ -Tocoferol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44
Esteróide não identificado (155, 197, 251, 377, 392)	7,42	-	3,18	4,87	5,79	2,28	3,03	-	1,62	3,76	1,35
Colesterol	10,44	13,03	11,38	20,54	1,54	21,81	17,76	14,65	14,88	28,7	25,28
α -Tocoferol	7,87	7,22	2,3	8,26	-	7,86	3,94	8,85	3,2	4,32	11,02
Ergosta-7,22-dien-3-ol	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	2,62	-
Ergosterol	4,48	2,29	2,36	4,43	1,89	2,06	1,44	-	1,16	1,86	1,25
Cholesta-3,5-dien-7-one	4,02	-	3	2,36	-	3,15	3,4	3,84	1,89	5,5	3,97
Campesterol	0,91	5,63	8,48	5,97	3,31	7,95	5,36	4,25	12,77	13,48	6,96
Cholest-4-en-3-one	10	8,4	9,23	3,36	-	1,81	1,34	2,08	0,46	6,01	1,01
Stigmasterol	-	-	-	-	-	1,34	-	-	0,93	2,89	0,62
Ergosta-5,8-dien-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-
Cholesta-4,6-dien-3-one	-	2,9	3,08	1,22	-	0,88	-	-	2,24	2,54	1,67

Stigmasta-4,6,22-trien-3.beta.-ol	-	-	-	0,89	-	5,5	-	-	2,18	0	1,93
γ-Sitosterol	-	-	-	-	0,73	4,67	2,9	-	5,12	4,05	2,19
Lanosterol	-	-	-	0,24	-	1,44	-	-	1,59	0,53	-
4-Campestene-3-one	-	3,05	2,99	1,74	-	-	-	-	-	-	-
Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	-	-	-	-	0,55	6,47	-	-	3,39	0,93	2,39
Derivado do γ-Sitosterol	-	0,47	-	-	-	2,54	-	-	1,12	-	0,22
γ-Sitostenone	-	-	-	-	-	2,34	-	-	-	-	-
Derivado do Stigmasterol	-	-	2,02	0,18	-	-	-	-	-	-	-

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todos os machos de *Ameivula sp. nov. 1* coletados em março de 2019. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC %). ♂1 – CRC = 9,9 cm; ♂2 – CRC = 10 cm; ♂3 – CRC = 10,1 cm; ♂4 – CRC = 10,5 cm; ♂5 – CRC = 10,8 cm; ♂6 – CRC = 10,9 cm; ♂7 – CRC = 11 cm; ♂8 – CRC = 11,1 cm; ♂9 – CRC = 11,2 cm; ♂10 – CRC = 11,3 cm; ♂11 – CRC = 11,6 cm; ♂12 – CRC = 11,6 cm; ♂13 – CRC = 11,7 cm e ♂14 – CRC = 11 cm.

Compostos	TIC (%)													
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♂6	♂7	♂8	♂9	♂10	♂11	♂12	♂13	♂14
Hexanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-
Hexanol	1,05	1,56	0,79	1,3	0,74	0,6	2,47	0,16	0,39	0,17	0,4	0,51	-	2,41
2-Nonenal	-	-	-	-	-	-	-	0,02	0,01	0,07	0,02	-	-	-
4-Decenal	-	-	-	-	-	0,06	-	0,06	0,55	0,19	0,11	-	-	-
2,4-Decadienal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-
Tridecanal	-	-	-	-	-	0,07	-	0,02	0,03	0,01	-	-	-	-
Tridecanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-
Pentadecanal	-	-	-	-	-	0,26	-	0,38	0,33	0,1	0,41	-	-	-
Ácido Tetradecanóico	-	-	-	-	-	0,96	-	1,27	1,07	0,28	1,21	-	-	-
Hexadecanal	-	1,22	1,65	0,26	1,56	1,66	-	1,74	1,45	0,95	0,8	1,4	1,05	-

Ácido Pentadecanóico	-	-	-	-	-	-	-	0,28	0,08	0,1	0,18	-	-	-
Aldeído não identificado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	0,3	0,52	-	-
Heptadecanal	-	-	-	-	-	0,63	-	0,24	0,33	0,32	0,35	-	-	-
Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,87	-	1,22	3,39	0,59	0,35	1,79	0,1	0,47	-	0,04	-	0,29	5,6
Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	-	-	-	1,13	-	1,47	0,26	0,49	0,83	0,59	-	-
Ácido Hexadecanóico	26,89	8,62	32,06	18,32	21,22	29,81	4,35	32,9	13,49	17,04	20,14	22,52	11,06	8,55
9,12-Octadecadienal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	-	4,87	6,15	4,46	3,2	2,42	5,61	0,13	1,34	0,03	0,77	2,59	1,34	5,18
9-Octadecenal	-	-	2,25	1,32	1,44	1,51	7,17	1,58	1,03	1,16	0,44	3,07	0,8	-
Octadecanal	-	-	1,92	1,21	1,79	2,5	3,29	1,08	1,43	1,15	0,34	1,93	0,91	2,76
Ácido graxo não identificado	-	-	0,1	-	0,17	0,41	-	0,24	-	0,49	-	0,13	-	-
Ácido Heptadecanóico	2,62	-	0,17	0,37	0,23	0,5	-	0,36	0,18	0,61	0,34	0,09	-	-
Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	-	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,79
Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	-	2,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,81
Metil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	0,6	1,43	-	-	1,69	-	-	-	-	-	0,11	2,74
Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	-	-	0,39	0,22	-	-	0,42	-	-	0,26	-	-
Ácido 9,12-Octadecadienóico	3,38	1,42	2,54	1,2	2,4	4,03	1,8	7,62	1,33	7,14	3,53	2,96	1,23	-
Ácido 9-Octadecenóico	9,05	4,22	7,17	3,88	4,96	12,34	2,89	17,02	3,34	9,74	7,37	18,13	7,37	-
Ácido Octadecanóico	9,3	4,62	3,14	3,51	9,22	6,35	-	7,14	1,9	6,27	4,58	9,06	3,84	-
Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	-	-	-	-	4,31	-	-	-	-	-	-	2,56
Hexadecanamida	4,26	4,76	3,77	1,15	0,73	-	-	2,45	1,66	1,09	1,7	2,22	1,98	-
Etil Éster do Ácido Octadecanóico	1,16	2,74	2,29	2,46	1,78	1,18	2,44	1,28	0,79	0,78	0,92	2,61	0,84	2,59
Cetona não identificada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,98	-	-	-
Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	-	-	-	-	-	0,39	-	-	-	-	-	-
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	-	-	-	-	-	-	0,37	-	0,07	-	-	0,09	-
Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,46	2,78	0,29	0,98	0,43	0,18	1,05	0,21	-	0,22	0,2	0,7	0,38	2,27
13-Docosenamida	-	2,69	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-

Esqualeno	2,36	10,99	5,47	6,05	4,02	1,82	7,64	0,64	2,31	0,85	1,11	10	21,42	12,95
Derivado do Cholesta-2,4-diene	-	2,8	0,13	0,79	0,98	0,49	1,62	0,24	0,37	0,28	0,36	0,62	-	2,37
Cholesta-4,6-dien-3-ol	0,68	4,16	1,14	1,85	1,66	0,89	2,16	0,51	0,58	0,57	0,68	1,3	1,23	4,4
Cholesta-3,5-diene	2,58	12,67	2,26	5,46	2,46	2,49	6,47	1,45	1,77	1,34	1,41	3,27	1,46	13,96
Ergosta-4,6,22-triene	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-
Derivado do Ergost-5-en-3-ol	2,14	6,12	1,94	-	1,96	1,52	7,68	0,36	0,66	1,14	1,7	1,93	1,48	6,95
Stigmasta-3,5-diene	-	0,46	0,57	3,3	0,89	0,58	-	0,43	-	1,15	1,6	0,69	0,86	2,74
Esteróide não identificado (155, 197, 251, 377, 392)	1,52	2,3	2,49	7,44	3,05	1,08	4,98	0,63	1,01	1,92	2,26	1,78	2,32	4,27
Colesterol	23,16	15,47	9,32	18,81	11,25	12,78	17,77	9,95	27,56	15,64	9,97	6,41	23,1	6,67
α -Tocoferol	-	-	-	-	8,92	-	-	2,97	-	-	4,07	3,4	1	1,68
Colestanol	1,48	-	0,67	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	3,12	-
Latosterol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-
Cholesta-3,5-dien-7-one	-	-	-	-	-	0,34	-	-	-	2,34	-	-	-	-
Ergosta-7,22-dien-3-ol	-	-	-	-	-	1,33	-	0,52	1,69	1,51	2,96	-	-	-
Campesterol	-	1,82	0,3	3,43	0,55	-	2,13	0,03	0,47	-	-	-	0,4	1,37
Campesterol	5,92	3,27	2,6	4,14	5,31	3,68	5,88	1,1	6,31	5,18	7,67	-	4,65	0,38
Cholest-4-en-3-one	0,36	0,44	0,14	-	0,4	-	0,89	-	-	0,7	-	0,15	0,24	-
Stigmasterol	-	-	0,53	-	-	0,41	-	0,57	1,49	1,24	3,47	-	1,34	-
Cholesta-4,6-dien-3-one	0,76	-	-	-	-	0,36	-	0,2	-	0,59	-	-	0,55	-
Stigmasta-4,6,22-trien-3.beta.-ol	-	-	0,94	-	4,21	3,24	3,92	0,78	6,82	6,34	7,04	1,16	1,59	-
γ -Sitosterol	-	-	0,61	-	-	1,38	-	0,75	3,59	2,41	4,46	-	2,23	-
Lanosterol	-	-	3,98	-	-	-	-	-	4,68	-	0,85	-	1,48	-
Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	-	-	-	-	3,49	0,44	-	-	6,44	5,73	3,39	-	-	-
Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico (257, 446)	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-
Derivado do γ -Sitosterol	-	-	-	-	-	-	-	-	2,08	2,14	1,04	-	-	-

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todos os machos de *Ameivula sp. nov.* 2. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC %). ♂1 – MTR41672, CRC = 6,9 cm; ♂2 – MTR41679, CRC = 7,7 cm; ♂3 – MTR41614, CRC = 8 cm; ♂4 – MTR41650, CRC = 8,7 cm; ♂5 – MTR41680, CRC = 8,7 cm; ♂6 – MTR41658, CRC = 9 cm; ♂7 – CRC = 7,5 cm; ♂8 – CRC = 8,1 cm; ♂9 – CRC = 8,4 cm; ♂10 – CRC = 8,5 cm; ♂11 – CRC = 8,5 cm; ♂12 – CRC = 8,6 cm; ♂13 – CRC = 8,9 cm; ♂14 – CRC = 9 cm e ♂15 – CRC = 9,1 cm.

Compostos	2018						TIC (%)									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♂6	♂7	♂8	♂9	♂10	♂11	♂12	♂13	♂14	♂15	
Hexanal	-	0,18	0,01	-	-	0,03	0,53	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hexanol	-	-	0,01	-	0,01	-	0,68	0,93	0,48	0,34	0,9	0,75	0,45	0,42	0,11	
4-Decenal	0,6	-	-	0,1	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	
Pentadecanal	0,14	-	-	-	-	0,06	0,13	-	0,45	-	-	-	-	-	0,1	
Ácido Tetradecanóico	0,34	-	0,15	0,17	0,02	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27	
Hexadecanal	1,39	0,22	-	0,05	0,02	0,13	1,43	0,94	1,02	1,16	0,77	1,61	2,28	0,83	0,94	
6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	-	-	-	-	-	0,03	-	0,12	-	0,03	0,09	0,06	0,02	-	0,03	
Ácido Pentadecanóico	0,24	-	0,14	0,1	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	
Heptadecanal	0,15	-	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-	-	0,13	
Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,64	-	-	-	0,05	-	0,42	-	0,38	0,25	0,51	0,99	0,28	0,51	0,2	
Ácido 9-Hexadecenóico	-	-	2,13	0,87	-	-	-	-	0,64	0,21	0,64	-	0,02	0,6	0,32	
Ácido Hexadecanóico	18,86	1,28	3,77	23,3	1,07	18,39	15,57	17,89	14,08	25,01	24,03	26,48	37,36	34,83	34,49	
Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	-	-	-	-	-	0,04	1,31	4,16	1,28	1,5	3,82	2,95	2,58	2,97	3,13	
9-Octadecenal	0,56	-	-	-	-	-	1,39	1,4	0,89	0,99	-	1,55	1,43	1,14	-	
Octadecanal	1,13	0,61	-	-	0,63	0,02	1,32	1,37	0,62	0,81	-	1,68	1,1	-	2,68	
Ácido graxo não identificado	0,15	-	-	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,47	
Ácido Heptadecanóico	0,29	-	0,82	0,18	-	0,3	-	0,45	-	0,11	0,51	0,13	0,2	0,21	1,36	
Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,65	-	-	-	0,25	-	-	0,27	-	0,23	-	0,72	0,14	0,18	0,53	
Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,24	-	-	-	0,67	-	-	0,35	-	0,15	0,37	0,49	0,18	0,26	0,49	

Ácido 9,12-Octadecadienóico	4,44	-	0,69	12,12	-	11,78	2,57	1,85	1,25	5,26	2,76	2,68	3,11	3,26	-
Ácido 9-Octadecenóico	7,72	20,94	27,77	11,67	17,35	5,04	5,36	3,65	2,56	14,39	7,61	6,01	12,79	12,85	20,92
Ácido Octadecanóico	3,6	8,9	16,73	4,93	-	4,93	5,2	6,5	-	9,33	10,59	7,66	5,82	7,87	10,93
Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	-	-	-	-	-	2,38	1,19	-	-	-	-	-	-
Hexadecanamida	0,23	1,93	0,22	0,19	1,08	0,34	-	0,85	-	1,77	3,3	4	2,47	2,44	2,5
Etil Éster do Ácido Octadecanóico	-	-	-	-	-	-	0,85	-	0,82	1,32	2,38	1,71	1,48	1,95	1,39
Éster não identificado do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	0,19	-	0,04	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-	-	0,67
Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	-	-	0,24	0,03	-	-	-	-	-	-	-	0,31	-	-
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,09	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	0,08	0,37
Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	-	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	0,24
Derivado do Cholest-5-en-3-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53	-	0,08	0,2	0,11
13-Docosenamida	-	-	-	-	-	0,68	-	-	-	-	0,84	-	-	0,78	-
Esqualeno	3,34	0,87	5,91	1,43	0,85	1,94	1,72	6,8	1,75	1,34	2,23	4,68	2,66	2,82	1,59
Cholesta-4,6-dien-3-ol	1,13	0,33	0,06	0,22	1,2	0,29	1,12	1,06	1,24	0,41	1,96	1,01	0,58	0,59	0,36
Cholesta-3,5-diene	0,79	0,65	0,19	0,14	1,89	0,52	4,33	1,09	6,26	0,66	5,67	3,16	1,28	1,25	0,52
Ergosta-4,6,22-triene	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-	0,39	-
Stigmasta-3,5-diene	0,41	-	-	0,04	-	1,36	0,94	-	1,91	0,49	-	-	0,53	-	0,44
Unidentified steroid (155, 197, 251, 377, 392)	0	1,83	-	0,14	-	-	1,25	2,38	-	0,97	1,56	2,1	1,38	2,69	0,99
Colesterol	31,51	26,54	19,93	26,14	20,26	29,02	28,43	20,84	30,58	14,79	21,19	13,27	7,46	9,44	5,53
α -Tocoferol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,11	-	-
Cholest-7-en-3-ol	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desmosterol	2,64	1,25	0,5	0,77	6,08	4,02	2,82	3,18	1,35	2,11	1,65	2,1	1,38	1,23	1,24
Ergosterol	1,78	0,44	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	1,19	-	0,57	0,23
Cholesta-3,5-dien-7-one	-	-	-	0,12	-	-	-	1,45	-	0,16	0,58	0,45	0,24	0,48	0,31
Campesterol	6,72	7,91	-	8,91	11,3	13,25	7,1	13,59	9,3	3,93	2,8	6,16	2,42	2,89	1,7
Stigmasterol	0,64	1,87	-	0,8	8,06	-	1,42	-	2,37	1,85	-	-	0,92	0,62	0,6
Stigmasta-4,6,22-trien-3.beta.-ol	5,11	5,75	-	1,42	9,86	4,81	4,76	-	6,14	2,04	1,89	5,14	2,06	3,73	0,86

γ -Sitosterol	1,53	6,44	-	2,4	6,67	2,14	3,08	3,3	5,21	4,05	-	-	2,97	-	0,72
Lanosterol	1,46	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Derivado do Cholesta-5,7-dien-3-ol	1,34	7,87	3,15	1,67	7,3	-	2,55	2,56	2,58	0,85	-	0,97	-	1,85	-
Derivado do γ -Sitosterol	-	2,52	-	0,82	5,32	-	0,77	0,64	0,9	1,66	-	-	0,7	-	-

Capítulo 4

Caracterização química da secreção de glândulas femorais de três espécies de *Kentropyx* (Squamata, Teiidae) da Amazônia brasileira

Abstract. The chemical information present in the lizard femoral glands is important in different social contexts and its chemical composition is known primarily to males of few species. The knowledge of the chemical composition of these secretions for a larger number of species is critical to understanding the role of chemical interactions in reproductive isolation and speciation processes. *Kentropyx altamazonica*, *K. calcarata* and *K. pelviceps* are three Teiinae species that actively thermoregulate in forested regions east of the Andes, have a high number of femoral pores and there is no information on their chemical composition in the literature. Females of *K. pelviceps* have a higher number of femoral pores and although this difference may only reflect of genetic variability, behavioral observations suggest that the substrate use may be a potential explanation for this pattern. The three species present a complex pattern of lipophilic compounds that seems to be more effective in predicting the species when comparing males than females. Differences in the reproductive status of females seem to have a major influence on the composition of secretions, reducing the number of compounds shared by them and the quality of the statistical analysis. The protein pattern is species specific for the *Kentropyx* species studied, but the similarity analysis shows that the observed differences are mainly sexual. Cholesterol was identified in almost all samples of the three species of *Kentropyx*, supporting the hypothesis that this steroid is a common compound in the femoral gland secretions of Teiidae.

Keywords. *Kentropyx altamazonica*, *Kentropyx calcarata*, *Kentropyx pelviceps*, lipophilic compounds, proteins.

Resumo. As informações químicas presentes nas glândulas femorais de lagartos são importantes em diferentes contextos sociais e sua composição química é conhecida

basicamente para machos poucas espécies. Conhecer a composição química dessas secreções para um maior número de espécies é fundamental para a compreensão do papel das interações químicas no isolamento reprodutivo e processos de especiação. *Kentropyx altamazonica*, *K. calcarata* e *K. pelviceps* são três espécies de Teiinae que termorregulam ativamente em regiões florestais à leste dos Andes, apresentam elevado número de poros femorais e não há na literatura informações acerca da composição química de suas secreções femorais. As fêmeas de *K. pelviceps* apresentaram maior número de poros femorais e, embora essa diferença possa ser apenas reflexo de diferenças genéticas entre as espécies, observações comportamentais sugerem que o substrato pode ser uma potencial explicação para esse padrão. As três espécies apresentaram padrão complexo de compostos lipídicos que parece ser mais efetivo para prever a espécie quando comparamos machos do que quando comparamos fêmeas. Diferenças no *status* reprodutivo das fêmeas parece ter grande influência na composição das secreções, reduzindo o número de compostos compartilhados pela maioria e a qualidade das análises estatísticas. O padrão proteico das espécies de *Kentropyx* é espécie específico, porém a análise de similaridade mostra que as diferenças observadas são principalmente sexuais. O colesterol foi identificado em quase todos os indivíduos das três espécies, reforçando a ideia de que este é um esteroide comum em secreções femorais de Teiidae.

Palavras-chave. Compostos lipofílicos, *Kentropyx altamazonica*, *Kentropyx calcarata*, *Kentropyx pelviceps*, proteínas.

Introdução

Sinais químicos são importantes na comunicação intraespecífica, incluindo contextos de seleção sexual, em muitas espécies de lagartos (MASON & PARKER, 2010). Embora as fezes e a pele possam apresentar informações químicas utilizadas nas interações entre indivíduos, as glândulas femorais e pré-anais são a principal fonte dessas informações em lagartos (ALBERTS *et al.*, 1992a; WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010). Mesmo antes de se conhecer o significado funcional das secreções femorais, já era conhecido que ocorriam, geralmente, em mesmo número em

machos e fêmeas; machos com glândulas maiores e maior produção de secreção (COLE, 1966). Atualmente sabe-se que a atividade das glândulas femorais sofre influência de hormônios andrógenos, é aumentada durante a estação reprodutiva (ALBERTS *et al.*, 1992) e apresenta importante papel em diferentes contextos sociais, incluindo escolha de parceiros e marcação de território.

O primeiro passo para compreensão dos sinais químicos em lagartos é a identificação dos compostos presentes nas secreções femorais e pré-anais, buscando por evidências daqueles que podem atuar como semioquímicos (MARTÍN *et al.*, 2013). Embora muitos compostos identificados nas secreções femorais e pré-anais sejam os mesmos entre diferentes linhagens (WELDON *et al.*, 2008), diferenças qualitativas e quantitativas são observadas e podem ser consequência tanto da história evolutiva quanto de condições ambientais e ecológicas (ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003; GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a; BAECKENS *et al.*, 2017; GARCÍA-ROA *et al.*, 2017). A base teórica sobre a composição química e o papel funcional das glândulas femorais de lagartos vem basicamente de espécies de representantes europeus da família Lacertidae (MARTÍN *et al.*, 2013). A maior parte dos estudos provém de secreções femorais obtidas de machos e quase não há informações disponíveis para fêmeas (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b). Em relação ao continente americano, as informações disponíveis referem-se basicamente a representantes dos Iguania. Há dados sobre a composição química das secreções de poucas espécies de Iguanidae e Liolaemidae e experimentos comportamentais que revelaram que, embora sejam animais conhecidos por serem visualmente orientados (COOPER JR., 1996), são capazes de obter uma série de informações de coespecíficos apenas com base em sinais químicos presentes nas secreções femorais e pré-anais (ALBERTS, 1990 e 1991; ALBERTS *et al.*, 1992a e b; ESCOBAR *et al.*, 2001; LABRA *et al.*, 2001 e 2002; ESCOBAR *et al.*, 2003). Para que se possa compreender a composição e o papel funcional das secreções em lagartos, assim como seu papel no isolamento reprodutivo e especiação críptica, é necessário que mais espécies de diferentes linhagens sejam analisadas (MARTÍN *et al.*, 2013).

Kentropyx é um gênero de Teiidae da subfamília Teiinae que apresenta tamanho corporal médio (CRC próximo à 12 cm em machos adultos) com distribuição à leste dos Andes na América do Sul (ÁVILA-PIRES, 1995). Atualmente o gênero compreende nove espécies, sendo que sete ocorrem no Brasil (UETZ *et al.*, 2019). *K. altamazonica*, *K. calcarata* e *K. pelviceps* são espécies do grupo *K. calcarata*

(WERNECK *et al.*, 2009) que vivem em florestas onde utilizam clareiras para termorregulação. *Kentropyx altamazonica* quando em simpatria com uma das outras duas espécies, ocupa locais mais abertos (ÁVILA-PIRES, 1995). Fêmeas e machos das três espécies apresentam poros femorais, cujo número total pode variar de 28 (em *K. altamazonica*) a 43 (em *K. pelviceps*) (ÁVILA-PIRES, 1995). Assim como observado em outros gêneros de Teiinae, as relações filogenéticas entre as espécies de *Kentropyx* ainda apresenta algumas inconsistências (WERNECK *et al.*, 2009) e há uma espécie híbrida identificada (REEDER *et al.*, 2002). Dados morfológicos colocam o gênero em posição mais basal entre os Teiinae (HARVEY *et al.*, 2012) e dados moleculares recuperam-no em posição mais interna, relacionada ao gênero *Cnemidophorus* (GOICOECHEA *et al.*, 2016). Dados ecológicos para *K. calcarata*, *K. pelviceps* e *K. altamazonica* indicam que, de forma genérica, as espécies apresentam reprodução prolongada, machos apresentam maior tamanho corporal e fêmeas e machos atingem a maturidade sexual por volta dos 8 cm de comprimento rostro-cloacal (VITT, 1991; VITT *et al.*, 1995 e 1997). Em *K. calcarata* foi observado o comportamento de cópula, que não envolveu corte elaborada por parte do macho, assim como ocorre em outras espécies de Teiidae (COSTA *et al.*, 2013).

Os Teiidae são um excelente modelo para estudos da composição química das secreções femorais e pré-anais para espécies brasileiras de lagartos. São lagartos com sistema vomeronasal bem desenvolvido (COOPER JR., 1996), elementos conspícuos da herpetofauna brasileira, há evidências de que utilizam informações químicas em diferentes contextos (YANOSKY *et al.*, 1993; BOFFIL & LEWIS, 1999; COOPER JR. *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2010; SAZIMA, 2015) e dados para *Salvator merianae* indicam composição lipídica complexa das secreção femoral em Teiidae (MARTÍN *et al.*, 2011). Dentro deste contexto o presente capítulo tem como objetivos (1) fornecer informações sobre a composição química das secreções femorais para três espécies de *Kentropyx* que ocorrem no domínio morfoclimático da Amazônia e (2) buscar por diferenças intra e interespecíficas que possam ser úteis na identificação das espécies, ampliando as informações sobre representantes da família Teiidae.

Materiais e Métodos

Amostragem

Foram obtidas 12 amostras de *Kentropyx altamazonica* (**Figura 1**), oito de *K. calcarata* (**Figura 2**) e 18 de *K. pelviceps* (**Figura 3**). Todas foram obtidas pelo Laboratório de Herpetologia do IB-USP durante viagens de campo em diferentes localidades da Amazônia brasileira (Licença: SISBIO 30309-8).



Figura 1. Macho (esquerda) e fêmea (direita) adultos de *Kentropyx altamazonica*.



Figura 2. Macho (esquerda) e fêmea (direita) adultos de *Kentropyx calcarata*.



Figura 3. Macho (esquerda) e fêmea (direita) adultos de *Kentropyx pelviceps*.

A **Tabela 1** apresenta todos os indivíduos amostrados com número de campo (MTR), sexo, localidade de coleta, comprimento rostro-cloacal (CRC), número de poros totais e técnica de análise química aplicada (cromatografia gasosa e espectrometria de massas e/ou eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE). Para todos os indivíduos a sexagem foi realizada através da inspeção direta das gônadas.

Tabela 1. Lista dos espécimes de *Kentropyx altamazonica*, *K. calcarata* e *K. pelviceps* amostrado para secreção femoral. Para cada indivíduo é apresentado o número de registro de campo (MTR), a localidade na qual foi obtido, o sexo, o comprimento rostro-cloacal (CRC) em centímetros e por qual metodologia foi analisada sua secreção. CG: cromatografia gasosa e espectrometria de massas. GEL: eletroforese em gel.

Espécie	MTR	Localidade	sexo	CRC	POROS	CG	GEL
<i>K. altamazonica</i>	36299	Açaí, Rio Içá, AM	F	9,9	35	X	X
	36227	Açaí, Rio Içá, AM	M	8,6	33	-	X
	40485	Santa Helena, Rio Negro, AM	M	7,8	29	X	-
	40408	Ilha Barro, Rio Negro, AM	F	7,9	37	X	-
	40486	Santa Helena, Rio Negro, AM	F	8,5	41	X	X
	40715	Santa Helena, Rio Negro, AM	M	8,7	34	X	X
	40717	Santa Helena, Rio Negro, AM	F	8,5	30	X	-
	40795	Curirú, Rio Negro, AM	M	9,1	41	X	-
	40767	Santa Helena, Rio Negro, AM	M	8,7	34	X	-
	40902	Santa Helena, Rio Negro, AM	M	9	34	-	X
	40501	Santa Helena, Rio Negro, AM	M	7,9	41	X	-
	40886	Queimada, Rio Negro, AM	F	8,6	33	X	X
<i>K. calcarata</i>	39786	Maturacá, Pico da Neblina, AM	F	8,7	36	X	X
	39891	Maturacá, Pico da Neblina, AM	F	8,8	32	X	X
	40461	Curirú, Rio Negro, AM	F	8,6	40	X	X
	40664	Curirú, Rio Negro, AM	F	8,6	35	X	-
	40789	Curirú, Rio Negro, AM	F	8,6	37	X	-
	40852	Curirú, Rio Negro, AM	F	9,3	37	X	-
	40957	Curirú, Rio Negro, AM	F	9,4	40	X	X
	40935	Curirú, Rio Negro, AM	M	7,98	39	X	X
<i>K. pelviceps</i>	35885	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	M	12.1	42	-	X
	35886	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	F	11.5	42	-	X
	35932	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	F	11.7	43	X	X
	36095	Açaí, Rio Içá, AM	M	11.5	40	-	X
	36108	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	M	11.9	46	X	X
	36110	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	M	10.7	40	X	X
	36172	Cuiauá, Rio Içá, AM	M	12	47	X	-
	36253	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	F	12.1	37	X	-
	36251	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	F	10.3	42	X	X
	36185	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	F	11.2	41	X	X
	40768	Santa Helena, Rio Negro, AM	F	9,2	42	X	-
	40830	Santa Helena, Rio Negro, AM	F	7,3	40	X	X
	41011	Boa Vista, AM	F	9,7	42	X	X
	41090	Boa Vista, AM	F	8,1	41	X	-
	41196	Boa Vista, AM	F	7,2	41	X	X
41204	Boa Vista, AM	F	8,2	42	-	X	

41341	Boa Vista, AM	F	10,1	44	X	-
41471	Boa Vista, AM	F	9,2	46	X	X

Análise química das secreções

A extração das secreções, sua preparação e a realização da cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS) seguiram o exposto na METODOLOGIA GERAL. Após a realização da CG-MS, a sobra de algumas amostras dissolvidas em solvente foram transferidas para microtubos de 500 μ L e o solvente foi removido por centrifugação a vácuo (*Speed-Vac Savant*). O material obtido após a remoção do solvente, assim como as amostras que não passaram previamente por CG-MS, seguiram a metodologia de extração de proteínas com acetonitrila 80% ácido trifluoracético 0,05% apresentada na METODOLOGIA GERAL.

Análise estatística

Para verificar se há variação no número total de poros femorais (POR) e no comprimento rostro-cloacal (CRC) entre as três espécies foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey (ZAR, 2010). Embora a descrição das três espécies não apresente evidência de dimorfismo sexual no número total de poros femorais (ÁVILA-PIRES, 1995), a presença de apenas um macho de *K. calcarata* impossibilitou testar a ocorrência de dimorfismo sexual e, por este motivo, optamos por realizar as comparações apenas entre fêmeas. Para as três espécies os dados apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,06$) e homogeneidade de variâncias (Levene, $p > 0,1$). Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa sobre presença/ausência de compostos em machos e fêmeas de cada uma das três espécies de *Kentropyx*. As análises estatísticas (METODOLOGIA GERAL) foram aplicadas na comparação de: (1) diferenças intersexuais em *K. altamazonica* e *K. pelviceps*, (2) diferenças entre machos de *K. altamazonica* e *K. pelviceps* e (3) diferenças entre fêmeas das três espécies. Para *K. calcarata* não foi possível realizar análises estatísticas comparando fêmeas e machos, pois obtivemos apenas uma amostra de macho.

Resultados

Comparação interespecífica: tamanho corporal e número de poros femorais

Há diferenças estatísticas em relação ao número total de poros femorais das três espécies (ANOVA, $F_{2,22} = 13,6$, $p = 0,001$). Fêmeas de *Kentropyx pelviceps* apresentaram maior número de poros femorais (Média \pm desvio Padrão: $41,76 \pm 2,08$) do que *K. calcarata* (Média \pm desvio Padrão: $36,71 \pm 2,81$) e *K. altamazonica* (Média \pm desvio Padrão: $35,2 \pm 4,14$) (**Figura 4**).

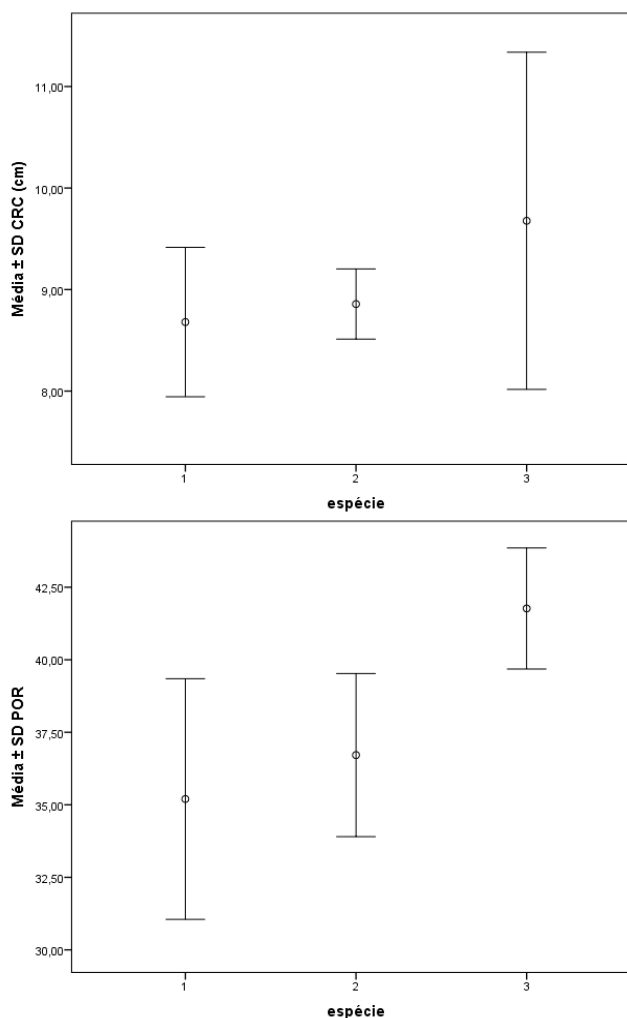


Figura 4. Média \pm desvio padrão (SD) do comprimento rostro-cloacal (CRC) e do número total de poros femorais em fêmeas de três espécies de *Kentropyx*. (1) *Kentropyx altamazonica*. (2) *Kentropyx calcarata*. (3) *Kentropyx pelviceps*.

Não foi observada diferença significativa no número de poros femorais entre *K. calcarata* e *K. altamazonica* (Tukey: $p = 0,6$). Não foram observadas diferenças

significativas no CRC de fêmeas das três espécies (ANOVA, $F_{2,22} = 1,55$, $p = 0,2$) (Figura 4).

Composição lipídica da secreção femoral

Kentropyx calcarata

Das sete amostras de fêmeas de *K. calcarata*, três apresentaram resultados insatisfatórios de CG-MS (MTR40664, MTR40789 e MTR40852). Essas fêmeas apresentaram nove ou menos compostos lipofílicos e muitos contaminantes e, por este motivo, foram excluídas das análises. As quatro fêmeas restantes mais o único macho, somaram 75 compostos (Tabela 2). O macho apresentou 19 compostos lipídicos: hexanol, 13-Docosenamida, três aldeídos, três ácidos graxos, três ésteres e oito esteroides. A secreção do macho foi basicamente composta por esteroides (TIC = 97,62%), principalmente o colesterol (TIC = 29,24%), o ergosta-5,7-dien-3-ol (TIC = 19,28%), o cholest-4-en-3-one (TIC = 17,94%) e o campesterol (TIC = 17,03%). O cholest-5-en-3-ol (TIC = 4,51%) foi o único composto identificado exclusivamente no macho.

Tabela 2. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreções femorais de fêmeas e macho adultos de *Kentropyx calcarata*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. Para o macho os dados são apresentados de maneira individual e para as fêmeas é apresentada a média e o desvio padrão (SD) das quatro amostras que apresentaram bons resultados.

TR	Compostos	TIC (%)		
		♂	♀ Média	♀ SD
3.8	2-Hexanona	-	0,04	0,07
3.9	Pentanol	-	0,06	0,11
4.0	Hexanal	-	0,67	1,21
4.2	Hexanol	0,03	0,09	0,11
8.4	2-Octenal	-	0,07	0,14
12.4	Nonenal	0,18	0,04	0,09
13.2	Nonanal	-	0,45	0,57
15.8	4-Decenal	0,03	0,14	0,17

16.4	Decanal	-	0,20	0,27
17.7	2-Undecenal	-	0,23	0,47
20.2	Ácido Decanóico	-	0,06	0,13
24.7	Etil Éster não identificado	-	0,05	0,10
25.9	Ácido Dodecanóico	-	0,07	0,14
26.9	Etil Éster do Ácido Dodecanóico	-	0,04	0,07
29.8	Ácido Tridecanóico	-	0,04	0,08
29.9	Pentadecanal	-	0,02	0,03
30.0	Ácido Tetradecanóico	-	0,24	0,49
30.9	Etil Éster do Ácido Tetradecanóico	-	0,06	0,06
31.0	Hexadecanal	0,1	0,07	0,08
32.2	Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	-	0,02	0,03
32.4	6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	0,1	-	-
32.6	Ácido graxo não identificado	-	0,02	0,03
32.8	Ácido Pentadecanóico	-	0,11	0,23
33.1	Ácido graxo não identificado	-	0,03	0,05
34.6	Ácido 9-Hexadecenóico	-	0,14	0,28
35.2	Ácido Hexadecanóico	-	3,33	6,67
35.4	Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	-	0,08	0,11
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,06	3,00	4,45
36.9	Ácido Heptadecanóico	-	0,07	0,13
37.3	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	-	0,20	0,25
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,71	2,09	4,19
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	-	0,81	1,63
38.8	Ácido graxo não identificado de 18C	-	1,31	2,62
39.0	Ácido Octadecanóico	-	5,45	10,91
39.1	Hexadecanamida	0,37	0,06	0,07
39.2	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	7,70	11,77
39.3	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	-	6,04	9,83
39.5	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	-	1,71	2,93
39.6	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	0,1	7,30	10,71
39.7	Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	-	0,28	0,55
39.8	Metil Éster do Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenóico	-	0,08	0,15
40.1	Ácido Eicosanóico	-	0,05	0,09
41.2	Etil Éster do Ácido Eicosanóico	-	0,04	0,09
41.5	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	-	0,32	0,38
42.1	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,02	0,13	0,26
42.2	Éster não identificado do Ácido 10,13-Eicosadienóico	-	0,34	0,69
42.3	Éster não identificado do Ácido 13-Eicosenóico	-	0,32	0,63
42.5	Amida não identificada	-	0,07	0,10
42.8	Etil Éster do Ácido Docosanóico	-	0,12	0,24
43.1	Octadecanamida	-	0,02	0,04
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,68	0,58	0,73
47.4	13-Docosenamida	-	6,63	13,17
47.6	Amida não identificada	-	0,42	0,84
48.0	Esqualeno	5,75	2,41	1,62

48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	-	0,26	0,36
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	2,97	1,31	2,11
48.9	Cholesta-3,5-diene	4,51	1,28	1,41
50.4	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0,9	1,01	2,02
51.2	3-methoxy-Cholest-5-ene	-	0,70	1,40
51.8	Colesterol	29,24	18,34	16,95
52.0	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	-	0,99	1,74
52.2	Tocoferol não identificado	-	0,11	0,21
52.4	Desmosterol	-	4,51	7,13
52.5	Ergosta-5,7-dien-3-ol	19,28	2,03	3,62
52.6	Cholestan-3-one	-	0,69	1,38
52.7	Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	-	0,69	1,39
53.0	Cholesta-3,5-dien-7-one	-	0,76	1,51
53.1	Campesterol	17,03	0,83	1,66
53.5	Cholest-4-en-3-one	17,94	6,00	9,40
53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	-	3,31	5,74
54.4	Derivado do Ergosterol	-	0,54	0,76
54.6	Derivado do Cholest-8-en-3-ol	-	2,47	4,55
55.1	4-Campestene-3-one	-	0,26	0,52

Nas quatro fêmeas foram identificados 72 compostos lipofílicos: esqualeno, 2-Hexanona, 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, dois álcoois, cinco cetonas, nove aldeídos, 16 ácidos graxos, 18 ésteres de ácidos graxos e 20 esteroides (**Tabela 2**). O número de compostos identificados por fêmea variou entre 23 e 42 (**Apêndice**). Apenas o cholesta-4,6-dien-3-ol e o colesterol foram identificados em todas as fêmeas e oito compostos foram identificados em três fêmeas. Apenas uma fêmea apresentou grande quantidade de ácidos graxos (TIC = 55,76%) e uma outra fêmea apresentou grande quantidade de amidas (TIC = 28,07%) (**Figura 5**). Três fêmeas apresentaram grande quantidade de ésteres de ácidos graxos, porém em porcentagens com ampla variação (TIC entre 8,13% e 88,01%) (**Figura 5**).

Dos 36 compostos identificados nas duas fêmeas da região de Maturacá, 13 foram identificados nas duas fêmeas e corresponderam à 88,6% (MTR39786) e 53,04% (MTR39891) das secreções (**Apêndice**). A fêmea que apresentou grandes quantidades de ésteres (MTR39786) apresentou evidência de desova recente e a outra fêmea (MTR39891), que apresentou folículos em vitelogênese, apresentou grandes quantidades de 13-Docosenamida (TIC = 26,39%) e esteroides, principalmente o colesterol (TIC = 10,01%), o cholest-4-en-3-one (TIC = 19,9%) e o cholesta-4,6-dien-3-one (TIC = 11,86%). Dos 57 compostos identificados nas duas fêmeas da região de

Curirú, apenas 10 foram identificados nas duas e corresponderam à 32,03% (MTR40957) e 80,47% (MTR40461) das secreções (**Apêndice**). As duas fêmeas apresentaram CRC = 9,4 cm, mas a fêmea com grandes quantidades de ácidos graxos apresentou ovos grandes no ovidutos e a com significativa quantidade de ésteres e muito esteroide, apresentou folículos vitelogênicos.

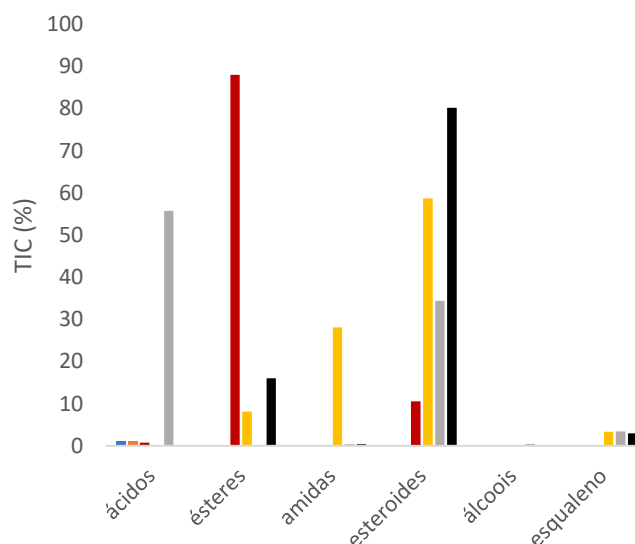


Figura 5. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada uma das principais classes de compostos lipofílicos que foram identificadas em fêmeas de *Kentropyx calcarata*. Vermelho: MTR39786. Amarelo: MTR39891. Cinza: MTR40957. Preto: MTR40461.

Kentropyx altamazonica

No total foram identificados 90 compostos lipofílicos em *K. altamazonica* (**Tabela 3**): esqualeno, γ -Tocoferol, dois álcoois, cinco cetonas, cinco amidas, 10 ácidos graxos, 16 aldeídos, 18 ésteres de ácidos graxos, 30 esteroides e dois compostos classificados como “outros”. Em fêmeas foram identificados 57 compostos lipídicos e os 23 compostos exclusivos somaram entre 4,36% e 31,46%. Machos somaram 67 compostos e os 37 exclusivos representaram entre 20,86% e 50,71% das secreções. O número de compostos identificados por indivíduo variou de 14 a 27 nas fêmeas e entre 15 e 43 nos machos (**Apêndice**).

Apenas seis compostos foram identificados em todas as fêmeas e sete foram compartilhados pelas quatro fêmeas da região de Curirú. A fêmea da região de Cachoerinha apresentou folículos em vitelogênese e sua secreção foi formada, principalmente, por ésteres (TIC = 9,25%), amidas (TIC = 17,88%), esqualeno (TIC =

19,61%) e esteroides (TIC = 51,59%) (**Figura 6**). As quatro fêmeas da região do Rio Negro apresentaram ovos em seus ovidutos e há significativas quantidades de ésteres (TIC entre 1,04% e 63,02%), esteroides (TIC entre 33,2% e 80,64%) e esqualeno (TIC entre 2,31% e 6,95%) (**Figura 6**). O colesterol e o cholest-4-en-3-one foram os dois esteroides mais abundantes nas amostras de fêmeas de *K. altamazonica*.

Tabela 3. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreções femorais de fêmeas e machos adultos de *Kentropyx altamazonica*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a média e o desvio padrão (SD) de sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	TIC (%)			
		♀		♂	
		Média	SD	Média	SD
3.8	2-Hexanona	0,07	0,16	0,01	0,03
4.0	Hexanal	0,42	0,92	-	-
4.2	Hexanol	0,88	0,94	0,27	0,43
11.2	3-Octen-2-ona	0,02	0,04	0,01	0,01
13.2	Nonanal	0,02	0,04	-	-
15.8	4-Decenal	0,01	0,01	0,00	0,01
16.4	Decanal	0,004	0,01	0,00	0,00
17.7	2-Undecenal	0,12	0,27	-	-
18.7	2,4-Decadienal	0,19	0,43	-	-
24.1	2-Dodecanona	-	-	0,002	0,004
24.2	Dodecanal	0,004	0,01	-	-
26.6	Tetradecanal	0,02	0,04	0,002	0,004
28.9	Furanona não identificada	-	-	0,002	0,004
29.2	Aldeído não identificado	0,12	0,27	0,03	0,05
29.8	Ácido Tridecanóico	-	-	0,02	0,05
29.9	Pentadecanal	-	-	0,002	0,004
30.0	Ácido Tetradecanóico	-	-	0,004	0,01
30.9	Etil Éster do Ácido Tetradecanóico	0,01	0,01	0,04	0,09
31.0	Hexadecanal	0,08	0,11	0,10	0,20
31.4	Hexadecanol	0,04	0,08	0,13	0,28
32.4	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	-	-	0,21	0,28
33.8	Heptadecanal	0,14	0,32	-	-
34.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,39	0,84	0,03	0,07
34.4	14-Methyl-8-Hexadecenal	0	0	0,05	0,10
34.6	Ácido 9-Hexadecenóico	0	0	0,11	0,16
35.2	Ácido Hexadecanóico	0,0	0,0	2,13	2,90
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	4,6	8,5	1,75	3,21
35.6	Cetona não identificada	-	-	0,01	0,02

35.8	Octadecanal	-	-	0,004	0,01
36.9	Ácido Heptadecanóico	-	-	0,06	0,09
37.3	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	0,81	1,29	-	-
37.4	Aldeído não identificado	0,01	0,02	-	-
37.5	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	0,03	0,06
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,02	0,04472136	0,03	0,06
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	-	6,30	11,19
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	-	-	9,33	12,33
38.8	Ácido graxo não identificado de 18C	-	-	0,24	0,53
39.0	Ácido Octadecanóico	-	-	3,46	5,98
39.1	Hexadecanamida	0,24	0,34	1,24	2,38
39.2	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	3,29	6,69	-	-
39.3	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	2,78	5,58	1,51	2,95
39.5	Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	1,07	2,11	-	-
39.6	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	2,60	4,19	2,83	5,99
39.7	Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	0,24	0,53	-	-
39.8	Metil Éster do Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenóico	0,05	0,10	0,17	0,37
39.9	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,23	0,51	-	-
41.5	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	-	-	0,21	0,46
42.1	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	-	0,02	0,05
42.4	Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	0,19	0,43	-	-
42.5	Amida não identificada	-	-	0,01	0,03
42.9	9-Octadecenamida	0,13	0,18	0,35	0,62
43.0	Aldeído não identificado	0,11	0,25	-	-
43.1	Octadecanamida	0,11	0,21	0,33	0,57
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,45	0,74	0,01	0,02
47.4	13-Docosenamida	3,67	7,95	-	-
48.0	Esqualeno	7,53	7,02	2,72	2,51
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,40	0,89	0,23	0,34
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	3,16	1,04	1,00	1,37
48.9	Cholesta-3,5-diene	5,95	6,64	1,23	1,01
49.2	Ergosta-4,6,22-triene	-	-	0,01	0,03
50.0	Esteróide não identificado (105, 155, 197, 251, 376)	-	-	0,23	0,22
50.4	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	-	-	0,17	0,31
51.2	3-methoxy-Cholest-5-ene	2,02	4,52	-	-
51.4	γ-Tocoferol	-	-	0,02	0,05
51.6	Stigmasta-3,5-diene	-	-	0,04	0,06
51.8	Colesterol	34,57	20,12	21,19	12,99
52.1	9-Hexadecenoic acid, octadecyl ester	0,42	0,95	-	-
52.4	Desmosterol	-	-	1,88	4,20
52.5	Ergosta-5,7-dien-3-ol	-	-	5,34	5,75
52.6	Cholestan-3-one	1,70	3,80	-	-
52.9	Ergosterol	-	-	0,66	1,47
53.0	Cholesta-3,5-dien-7-one	0,99	2,21	-	-
53.1	Campesterol	0,32	0,46	5,69	4,03
53.5	Cholest-4-en-3-one	15,49	6,26	16,98	19,29

53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	2,38	3,35	0,82	0,70
54.0	2,4-Cholestadien-1-one	-	-	0,80	1,15
54.2	Derivado do Ergosterol	-	-	2,04	4,17
54.3	Derivado do Cholest-8-en-3-ol	0,89	2,00	-	-
54.4	Lanost-8-en-3-ol	-	-	0,02	0,04
54.5	Lanosta-8,24-dien-3-one	-	-	0,82	1,39
54.6	γ -Sitosterol	-	-	0,22	0,34
54.7	Lanosterol	0,43	0,97	1,09	2,44
54.9	Derivado do Stigmasterol	-	-	0,09	0,21
55.0	Hexadecanoic acid, hexadecyl ester	0,11	0,24	0,06	0,14
55.1	4-Campestene-3-one	-	-	2,77	4,49
57.7	Stigmastanol	-	-	1,31	2,93
57.9	Cholest-4-ene-3,6-dione	-	-	1,14	1,66
58.0	Derivado do Cholest-4-en-3-one	-	-	0,38	0,84
58.1	9-Hexadecenoic acid, eicosyl ester	0,14	0,32	-	-
58.5	Octadecanoic acid, hexadecyl ester	0,29	0,64	-	-

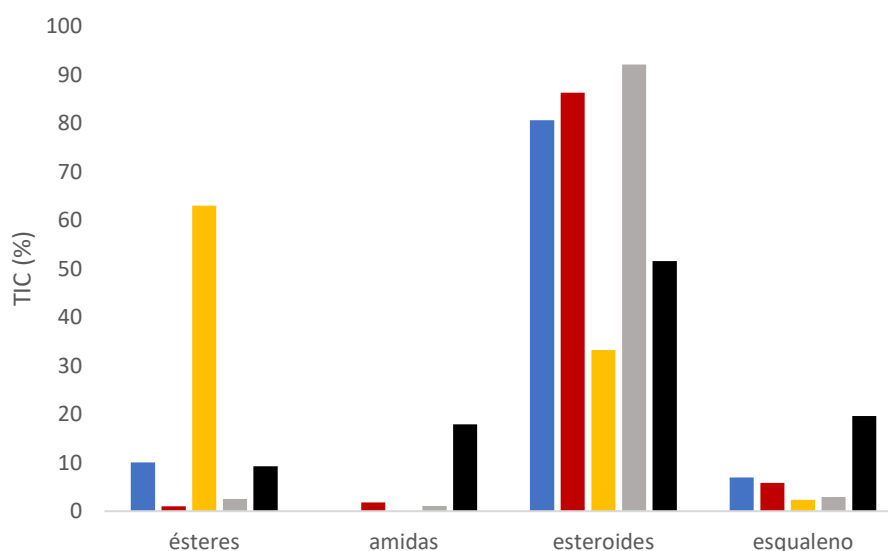


Figura 6. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada uma das principais classes de compostos lipofílicos que foram identificadas em fêmeas de *Kentropyx altamazonica*. Azul: MTR40408. Vermelho: MTR40486. Amarelo: MTR40717. Cinza: MTR40886. Preto: MTR36299.

Apenas cinco compostos foram identificados em todos os machos. Três machos apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos (TIC > 19%), sendo que um deles também apresentou muitos ésteres de ácidos graxos (TIC = 28,53%) (**Figura 7**). Nos machos o esqualeno variou entre 0 e 5,69% (**Figura 7**) e a quantidade de esteroides variou de forma significativa (TIC entre 21,22% e 99,81%). O colesterol foi um dos esteroides mais abundantes em todos os indivíduos (TIC entre 11,09% e 43,83%). Os dois machos que não apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos ou ésteres apresentaram grande porcentagem de cholest-4-en-3-one (TIC = 20,1% e 49,25%).

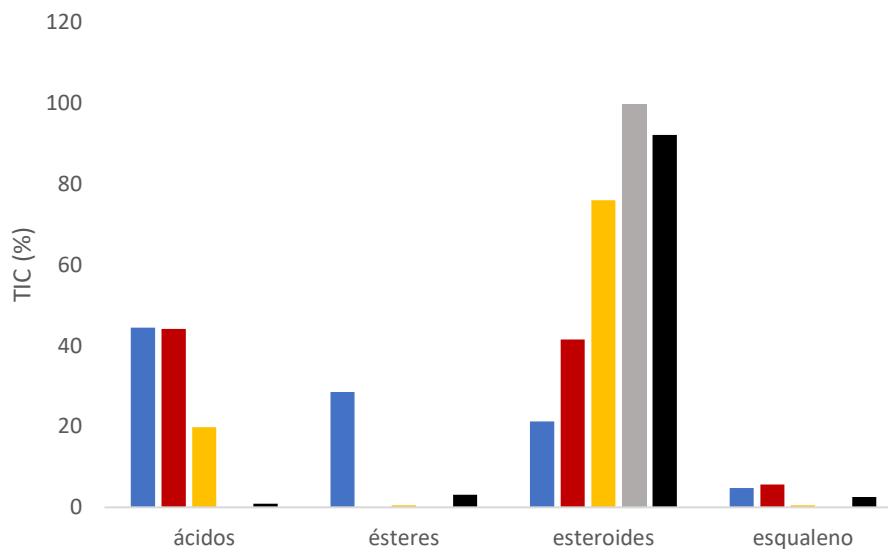


Figura 7. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada uma das principais classes de compostos lipofílicos que foram identificadas em machos de *Kentropyx altamazonica*. Azul: MTR40485. Vermelho: MTR40501. Amarelo: MTR40715. Cinza: MTR40767. Preto: MTR40795.

O resultado da PERMANOVA na comparação entre o perfil químico das secreções femorais de machos e fêmeas de *K. altamazonica*, revelou não haver diferenças significativas entre os sexos, quando comparados todos os compostos lipofílicos identificados (PERMANOVA: *pseudo* $F_{1,10} = 1,03$ e $p = 0,3$). Sete compostos foram identificados em, pelo menos, três fêmeas e três machos e foram selecionados para as análises estatísticas: hexanol, éster etílico do ácido hexadecanóico, esqualeno, cholesta-4,6-dien-3-ol, cholesta-3,5-diene, colesterol e cholest-4-en-3-one. Nenhum composto apresentou diferença estatística entre machos e fêmeas ($p < 0,05$) e os dois primeiros componentes principais da análise realizada com estes compostos explicou 83,05% da variação entre os dois sexos (**Figura 8**). O PC1 explicou 56,06% da variação e apresentou correlação positiva e significativa com o éster etílico do ácido hexadecanóico e o PC2 explicou 26,99% da variação e apresentou correlação negativa com o hexanol. A análise discriminante realizada com os escores desses dois componentes classificou corretamente 60% dos indivíduos, falhando com a correta classificação de duas fêmeas e dois machos. Quando adicionamos à análise discriminante os escores do PC3, que explicou 15,12% da variação e apresentou correlação positiva com o cholesta-4,6-dien-3-ol, 100% dos indivíduos foram classificados corretamente de acordo com o sexo.

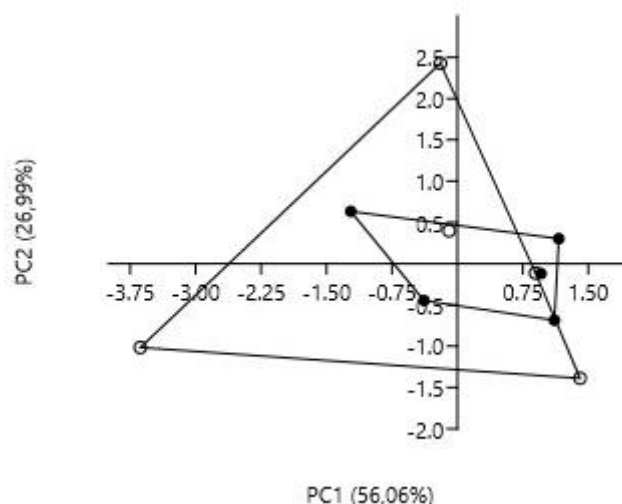


Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação de machos (círculos abertos) e fêmeas (círculos fechados) de *Kentropyx altamazonica* de acordo com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de sete compostos lipofílicos.

Kentropyx pelviceps

Duas amostras de fêmeas de *K. pelviceps* apresentaram menos de 10 compostos lipofílicos identificados e por isso foram excluídas das comparações. As oito amostras de fêmeas que apresentaram bons resultados e as três amostras de machos, somaram 96 compostos identificados (**Tabela 4**): esqualeno, 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, duas formas do tocoferol, três álcoois, cinco cetonas, seis amidas, doze ácidos graxos, 18 esteroides, 20 aldeídos e 28 ésteres de ácidos graxos. Dos 88 compostos identificados em fêmeas, 40 foram compartilhados com machos e os 48 compostos exclusivos somaram entre 0,52% e 50,12% das secreções. Machos apresentaram 48 compostos lipídicos, sendo oito exclusivos (TIC entre 25,17% e 53,27%). O número de compostos identificados por indivíduo variou de 12 a 50 nas fêmeas e entre 13 e 37 nos machos (**Apêndice**).

Três fêmeas não apresentaram evidência de estarem reprodutivas, somaram 64 compostos, sendo 18 compostos identificados em duas ou três delas (**Apêndice**). Essas fêmeas apresentaram padrões químicos distintos: uma com grande quantidade de esqualeno (TIC = 15,98%) e esteroides (TIC = 81,65%), uma apresentando a secreção formada basicamente por ésteres (TIC = 72,93%) e a terceira com secreção formada, principalmente, por aldeídos (TIC = 14,05%) e esteroides (TIC = 73,05%). Duas fêmeas

apresentaram ovos no ovidutos, somaram 43 compostos lipídicos, 14 compostos foram compartilhados pelas duas. Uma das fêmeas apresentou 33,2% da secreção formada por ácidos graxos e 56,34% por esteroides e a segunda fêmea teve 96,79% da secreção representada por esteroides. Os dois esteroides mais abundantes nessas duas fêmeas foram o colesterol e o cholesta-4-en-3-one. Três fêmeas apresentaram folículos em vitelogênese secundária. Quarenta e seis compostos lipídicos foram identificados nessas fêmeas, sendo 14 identificados em duas ou três fêmeas. Duas dessas fêmeas apresentaram secreção formada basicamente por esteroides (TIC > 84%) e uma delas por esteroides (TIC = 41,87%) e amidas (TIC = 48,4%).

Tabela 4. Compostos lipofílicos identificados nas amostras de secreções femorais de fêmeas e machos adultos de *Kentropyx pelviceps*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a média e o desvio padrão (SD) de sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	TIC (%)			
		♀		♂	
		Média	SD	Média	SD
3.8	2-Hexanona	0,03	0,05	-	-
4.0	Hexanal	2,05	4,79	0,83	1,43
4.1	2-Heptenal	0,07	0,12	0,69	0,89
4.2	Hexanol	0,48	0,91	-	-
8.4	2-Octenal	0,03	0,09	-	-
9.3	Octenol	0,02	0,06	-	-
9.7	2,4-Nonadienal	0,03	0,09	0,31	0,41
11.2	3-Octen-2-one	0,08	0,10	0,16	0,27
12.4	Nonenal	0,02	0,06	0,07	0,12
13.2	Nonanal	0,09	0,12	0,53	0,69
13.4	Etil Éster do Ácido 10-Undecenóico	0,02	0,05	0,17	0,30
15.8	4-Decenal	0,05	0,08	0,27	0,13
16.4	Decanal	0,03	0,05	1,60	2,71
17.1	4-Tridecanona	0,03	0,10	-	-
17.7	2-Undecenal	0,32	0,37	0,49	0,59
18.7	2,4-Decadienal	0,18	0,18	0,31	0,54
19.2	2,4-Dodecadienal	0,25	0,25	0,32	0,55
20.2	Ácido Decanóico	0,01	0,02	0,34	0,58
24.2	Dodecanal	0,03	0,05	0,12	0,21
25.9	Ácido Dodecanóico	0,06	0,11	-	-
26.6	Tetradecanal	0,04	0,09	0,45	0,77
26.9	Etil Éster do Ácido Dodecanóico	0,02	0,06	-	-

28.4	Pentadecanol	0,09	0,26	-	-
29.9	Pentadecanal	0,01	0,02	-	-
30.0	Ácido Tetradecanóico	0,24	0,49	0,26	0,44
30.8	Etil Éster não identificado	0,11	0,27	-	-
30.9	Etil Éster do Ácido Tetradecanóico	0,03	0,05	-	-
31.0	Hexadecanal	-	-	0,30	0,35
32.2	Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	0,07	0,19	-	-
32.4	6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	0,00	0,00	0,42	0,52
32.8	Ácido Pentadecanóico	0,04	0,10	0,24	0,42
33.8	Heptadecanal	0,01	0,02	0,22	0,38
34.0	2-Heptadecanona	0,07	0,18	-	-
34.1	Etil Éster do Ácido Pentadecanóico	0,04	0,10	-	-
34.2	Metil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	0,003	0,01	-	-
34.3	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,08	0,17	-	-
34.4	14-Methyl-8-Hexadecenal	0,11	0,25	0,08	0,13
34.5	Aldeído não identificado	0,05	0,13	-	-
34.6	Ácido 9-Hexadecenóico	0,22	0,43	-	-
35.2	Ácido Hexadecanóico	2,26	4,97	5,29	9,17
35.3	9-Octadecenal	0,06	0,17	0,22	0,24
35.4	Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	0,26	0,73	-	-
35.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	3,11	5,94	0,04	0,07
36.9	Ácido Heptadecanóico	0,05	0,09	-	-
37.3	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	0,03	0,07	-	-
37.5	Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,03	0,10	-	-
37.6	Metil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,02	0,06	-	-
38.2	Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0,03	0,07	-	-
38.5	Ácido 9,12-Octadecadienóico	1,02	2,04	0,92	1,60
38.6	Ácido 9-Octadecenóico	0,36	1,00	1,20	2,08
39.0	Ácido Octadecanóico	1,34	3,80	3,37	5,83
39.1	Hexadecanamida	0,18	0,36	0,65	1,12
39.2	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	3,50	9,91	-	-
39.3	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	1,38	3,87	0,05	0,09
39.6	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	1,73	3,44	-	-
39.7	Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	0,13	0,24	-	-
39.8	Metil Éster do Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenóico	0,02	0,06	-	-
39.9	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,34	0,49	1,24	1,74
40.0	Ácido 11-Eicosenóico	0,16	0,44	-	-
41.2	Etil Éster do Ácido Eicosanóico	0,23	0,64	-	-
41.5	Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	0,03	0,09	-	-
42.1	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	-	-	0,04	0,06
42.2	Éster não identificado do Ácido 10,13-Eicosadienóico	0,07	0,18	-	-
42.3	Éster não identificado do Ácido 13-Eicosenóico	0,09	0,24	-	-
42.5	Amida não identificada	0,06	0,13	-	-
42.6	Éster não identificado do 9-Octadecenóico	0,05	0,13	-	-
42.7	Éster não identificado de 18C	0,01	0,03	-	-

42.9	9-Octadecenamida	0,14	0,39	-	-
43.1	Octadecanamida	0,06	0,16	0,18	0,31
47.2	Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0,25	0,48	0,52	0,90
47.3	11-Eicosenamida	0,07	0,21	-	-
47.4	13-Docosenamida	5,30	14,34	-	-
47.8	Octacosanal	0,04	0,12	-	-
48.0	Esqualeno	4,07	5,31	1,36	2,36
48.2	Cholesta-2,4-diene	-	-	0,21	0,37
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,16	0,29	1,09	0,41
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	5,12	3,13	5,18	2,53
48.9	Cholesta-3,5-diene	4,18	4,48	4,99	2,46
50.4	Derivado do Ergost-5-en-3-ol	2,32	4,97	-	-
51.2	3-methoxy-Cholest-5-ene	0,02	0,06	-	-
51.4	γ -Tocoferol	-	-	0,01	0,01
51.6	Stigmasta-3,5-diene	3,97	7,18	0,00	0,00
51.8	Colesterol	29,92	21,52	-	-
51.9	α -Tocoferol	-	-	0,30	0,52
52.5	Ergosta-5,7-dien-3-ol	1,87	3,49	0,42	0,72
53.0	Cholesta-3,5-dien-7-one	3,03	5,41	5,18	4,15
53.1	Campesterol	3,38	5,91	-	-
53.5	Cholest-4-en-3-one	10,65	10,08	8,48	7,78
53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	1,89	2,92	4,96	4,53
54.4	Derivado do Ergosterol	0,31	0,88	-	-
54.6	Derivado do Cholest-8-en-3-ol	0,11	0,31	-	-
54.7	Lanosterol	0,81	2,29	-	-
55.0	Hexadecanoic acid, hexadecyl ester	0,00	0,00	9,79	7,07
57.7	Stigmastanol	0,35	1,00	-	-
58.3	9-Octadecenoic acid, hexadecyl ester	-	-	25,80	20,60
58.5	Octadecanoic acid, hexadecyl ester	-	-	1,48	2,56

Dez compostos foram identificados nos três machos, todos da região do Rio Içá (**Apêndice**). Dezenove compostos foram identificados em dois ou três machos. Todos os machos apresentaram grandes quantidades de ésteres (TIC > 27%), especialmente dois de elevado peso molecular (hexadecanoic acid, hexadecyl ester e 9-Octadecenoic acid, hexadecyl ester) (**Figura 9**). O macho que apresentou menores quantidades de ésteres, apresentou maiores quantidades de aldeídos (TIC = 18,26%) e ácidos graxos (TIC = 34,86%). O resultado da PERMANOVA na comparação entre o perfil químico das secreções femorais de machos e fêmeas de *K. pelviceps*, revelou não haver diferenças significativas entre os sexos, quando comparados todos os compostos lipofílicos identificados (PERMANOVA: *pseudo* $F_{1,11} = 0,87$ e $p = 0,5$). Seis compostos foram identificados em, pelo menos, três fêmeas e três machos e foram selecionados

para as análises estatísticas: nonanal, 4-Decenal, cholesta-4,6-dien-3-ol, cholesta-3,5-diene, colesterol e cholesta-3,5-dien-7-one. Nenhum composto apresentou diferença estatística entre machos e fêmeas ($p < 0,08$) e os dois primeiros componentes principais da análise realizada com estes compostos explicou 87,72% da variação entre os dois sexos (**Figura 10**). O PC1 explicou 55,2% da variação e apresentou correlação positiva e significativa com o nonanal e o PC2 explicou 32,52% da variação e apresentou correlação positiva com o 4-Decenal. A análise discriminante realizada com os escores desses dois PC2 classificou corretamente 72,73% dos indivíduos, errando a classificação de três fêmeas. Quando adicionamos à análise discriminante os escores do PC3, que explicou 9,52% da variação e apresentou correlação positiva com o cholesta-4,6-dien-3-ol, os resultados são os mesmos observados para os escores de dois componentes principais.

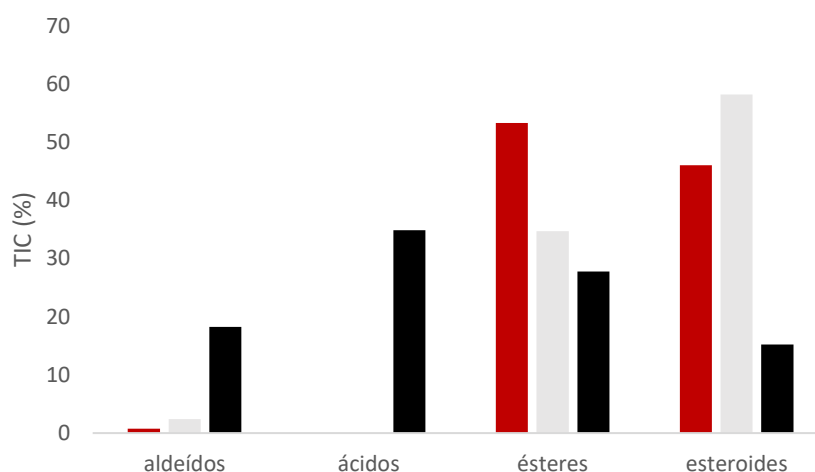


Figura 9. Somatória da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada uma das principais classes de compostos lipofílicos que foram identificadas nos três machos de *Kentropyx pelviceps*. Vermelho: MTR36110. Cinza: MTR36108. Preto: MTR36172.

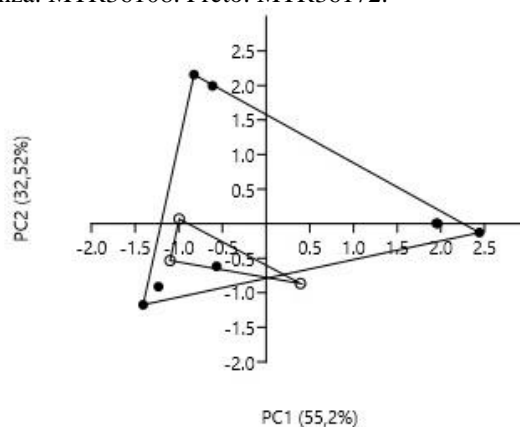


Figura 10. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação de machos (círculos abertos) e fêmeas (círculos fechados) de *Kentropyx pelviceps* de acordo com a porcentagem relativa à corrente total de íons de sete compostos lipofílicos.

Compostos lipofílicos: comparações

Machos

Machos de *K. pelviceps* e de *K. altamazonica* somaram 88 compostos lipídicos, 40 compostos foram exclusivos de *K. altamazonica* e 21 de *K. pelviceps*. O hexadecanoic acid, hexadecyl ester foi identificado nas duas espécies, em *K. pelviceps* correspondeu a mais de 5% das secreções, enquanto em *K. altamazonica* correspondeu a 0,46% de um único macho. O 9-Octadecenoic acid, hexadecyl ester representou entre 6,09% e 47,19% das secreções dos machos de *K. pelviceps* e não foi identificado nas amostras de *K. altamazonica*. Os dois esteroides mais abundantes nos machos das duas espécies foram o colesterol e o cholest-4-en-3-one. O teste de PERMANOVA, com base em todos os compostos identificados, revelou que não há diferenças estatísticas entre os padrões químicos dos machos das duas espécies (PERMANOVA: *pseudo* $F_{1,7} = 1,05$ e $p = 0,3$). Apenas três compostos foram identificados simultaneamente nos três machos de *K. pelviceps* e em três machos de *K. altamazonica* e foram selecionados para as estatísticas. Machos de *K. pelviceps* apresentaram maiores porcentagens de cholesta-3,5-diene (Mann-Whitney: $U = 0,03$) e menores de colesterol (ANOVA: $F_{1,6} = 7,7$ e $p = 0,03$). O cholesta-4,6-dien-3-ol não apresentou diferenças entre os machos das duas espécies (Mann-Whitney: $U = 0,07$).

A análise de componentes principais realizada com esses três compostos explicou 96,88% da variação entre os machos das duas espécies com apenas um componente principal, que apresentou correlação significativa e positiva com o cholesta-4,6-dien-3-ol e o PC2 explicou apenas 2,94% da variação e teve correlação negativa com o cholesta-3,5-diene (**Figura 11**). A discriminante com base nos escores desses dois PCs classificou corretamente 87,5% dos machos das duas espécies, classificando de forma errada apenas um macho de *K. altamazonica*.

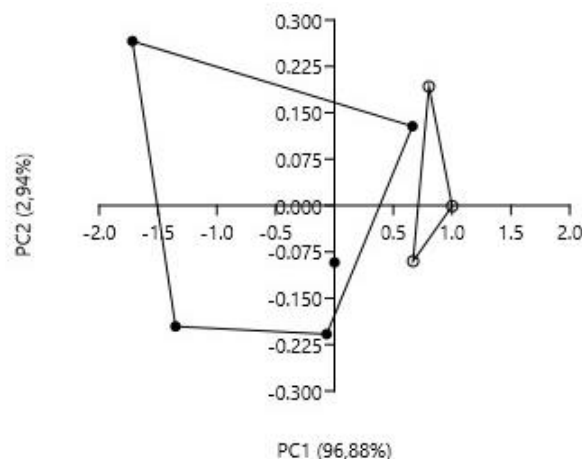


Figura 11. Análise de componentes principais (PCA) mostrando a separação de machos de *Kentropyx pelviceps* (círculos abertos) e *K. altamazonica* (círculos fechados) com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de três compostos lipofílicos. Círculos fechados: *K. altamazonica*. Círculos abertos: *K. pelviceps*.

Fêmeas

Um total de 114 compostos lipofílicos foram identificados nas fêmeas das três espécies. Trinta e dois compostos estão presentes em, pelo menos, uma fêmea de cada uma das espécies e esses compostos representaram entre 47,85% e 100% das secreções de *K. calcarata*, entre 61,25% e 99,19% das secreções de *K. pelviceps* e entre 89,61% e 98,49% das secreções de *K. altamazonica*. O número de compostos exclusivos foi de 15 para *K. calcarata* e para *K. pelviceps* e nove para *K. altamazonica*. Só em fêmeas de *K. pelviceps* foram observadas amostras com quantidades significativas de cholesta-3,5-dien-7-one e/ou campesterol. Em todas as espécies há fêmeas que apresentaram grandes quantidades de esqualeno, de 13-Docosenamida, de ácidos graxos e/ou ésteres. Apenas uma fêmea de *K. pelviceps* não apresentou colesterol.

O teste de PERMANOVA, com base em todos os compostos identificados, revelou que não há diferenças estatísticas entre os padrões químicos das fêmeas das três espécies (PERMANOVA: *pseudo* $F_{1,7} = 1,02$ e $p = 0,3$). Nove compostos lipídicos foram detectados em três ou mais fêmeas de cada uma das espécies e foram utilizados nas análises estatísticas subsequentes. Esses nove compostos não apresentaram diferenças estatísticas entre as três espécies ($p > 0,3$).

Os três primeiros componentes principais da PCA explicaram 79,91% da variação entre as fêmeas (**Figura 12**). O PC1 explicou 41,02% dessa variação e teve correlação significativa e positiva com o éster etílico do ácido hexadecanóico e o PC2 foi responsável por 25,42% da variação e teve correlação negativa com o éster etílico do ácido octadecanóico. A análise discriminante com base nos escores dos três primeiros PCs classificou corretamente apenas 42,11% das fêmeas de *Kentropyx*. Uma fêmea de *K. calcarata* foi classificada como *K. pelviceps* e três como *K. altamazonica*. Duas fêmeas de *K. pelviceps* foram classificadas como *K. calcarata* e três como *K. altamazonica*. Uma fêmea de *K. altamazonica* foi classificada como *K. pelviceps* e uma como *K. calcarata*.

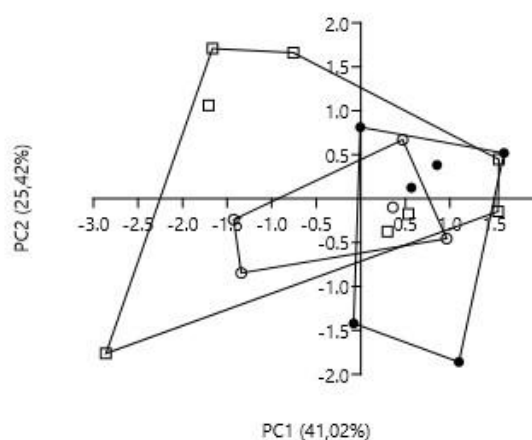


Figura 12. Análise de componentes principais (PCA) mostrando separação de fêmeas das três espécies de *Kentropyx* com base na porcentagem relativa à corrente total de íons de nove compostos lipofílicos. Círculos fechados: *K. calcarata*. Círculos abertos: *K. altamazonica*. Quadrados: *K. pelviceps*.

Padrão proteico

Foi determinado o padrão proteico para três machos e duas fêmeas de *K. altamazonica*, três fêmeas e um macho de *K. calcarata* e dois machos e uma fêmea de *K. pelviceps* (**Figura 13**). No total foram identificadas 12 bandas de proteicas entre 7 KDa e 48 KDa. Em *K. altamazonica* foram identificadas dez bandas: a banda de 48 KDa só foi observada em dois indivíduos, a banda de 27 KDa só foi observada em uma fêmea, as bandas de 7 KDa e 10 KDa foram observadas em três indivíduos e duas bandas (16 KDa e 18 KDa) foram observadas em apenas um macho da espécie.

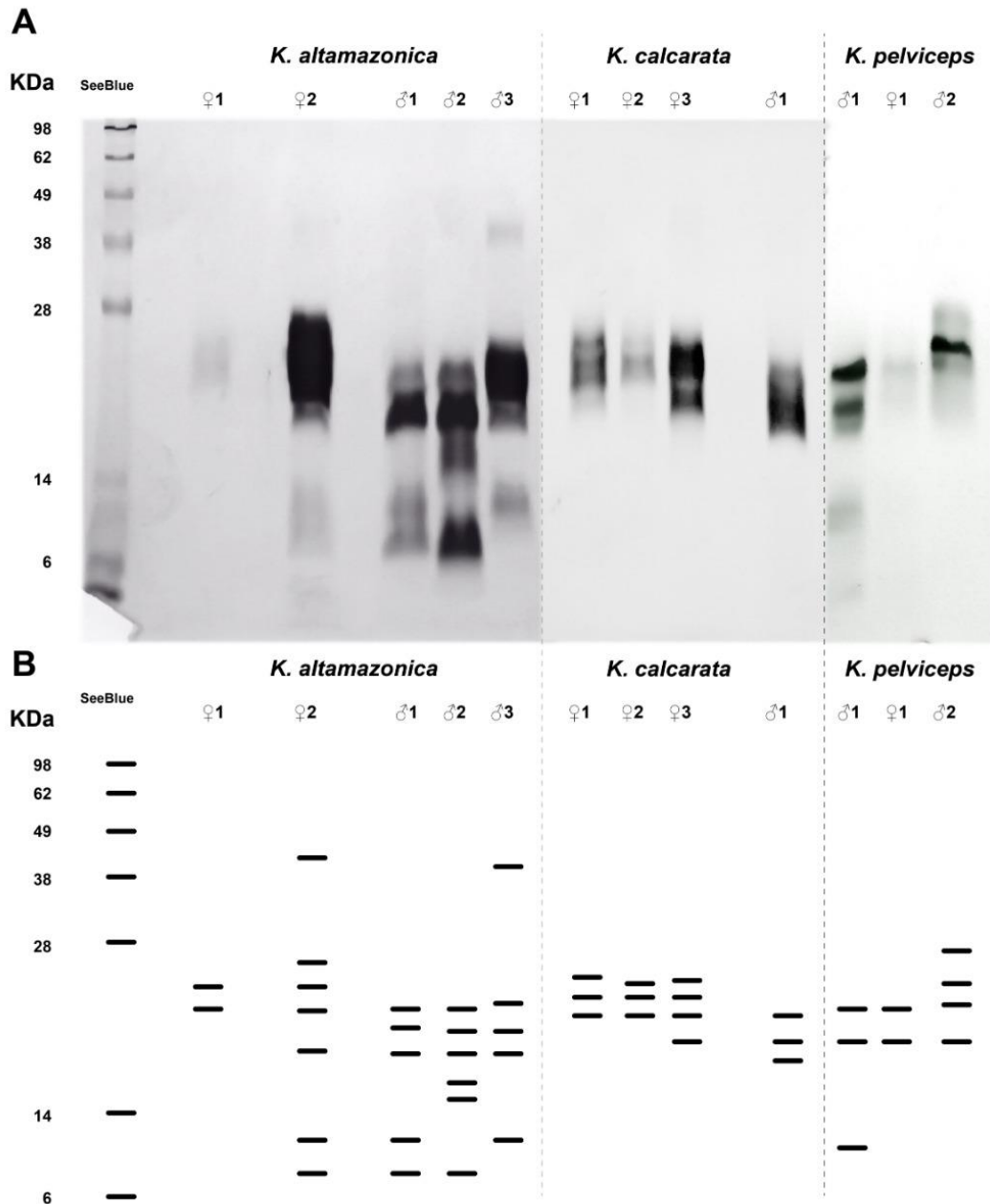


Figura 13. Padrão de bandas proteicas de indivíduos adultos de três espécies de *Kentropyx* e marcador de peso molecular SeeBlue. **(A)** Imagem original da eletroforese em gel SDS-PAGE em coloração com ComassieBlue e **(B)** mapa indicando as bandas que podem ser observadas no gel. *K. altamazonica*: ♀1 – MTR40486, CRC = 8,5 cm, ♀2 – MTR36299, CRC = 9,9 cm, ♂1 – MTR40715, CRC = 8,7 cm, ♂2 – MTR40902, CRC = 9 cm e ♂3 – MTR36227, CRC = 8,6 cm. *K. calcarata* - ♀1 – MTR39786, CRC = 8,7 cm, ♀2 – MTR39891, CRC = 8,8 cm, ♀3 – MTR40957, CRC = 9,4 cm e ♂1 – MTR40715, CRC = 8,7 cm. *K. pelviceps*: ♂1 – MTR36108, CRC = 11,9 cm, ♀1 – MTR35932, CRC = 11,7 cm e ♂2 – MTR36110, CRC = 10,7 cm.

Em *K. calcarata* foram identificadas cinco bandas de proteínas: as bandas de 25 KDa e 23 KDa foram observadas apenas em fêmeas, a banda de 20 KDa foi observada

em todos os indivíduos, a banda de 18 KDa foi observada em uma fêmea e um macho e a banda de 16 KDa foi observada apenas no macho. Em *K. pelviceps* foram observadas seis bandas: a banda de 27 KDa, 23 KDa e 8 KDa foi observada em apenas um macho.

O fenograma criado com base na matriz de similaridade das bandas proteicas observadas em cada indivíduo, mostra que não há separação das amostras por espécies (**Figura 14**). A similaridade do padrão proteico parece ser maior entre machos ou fêmeas, independente da espécie. Uma fêmea de *K. pelviceps*, que apresentou resultados insatisfatórios de CG-MS apresentou maior similaridade com a maioria dos machos e um macho de *K. pelviceps* e um de *K. altamazonica* apresentaram maior similaridade com a maior parte das fêmeas.

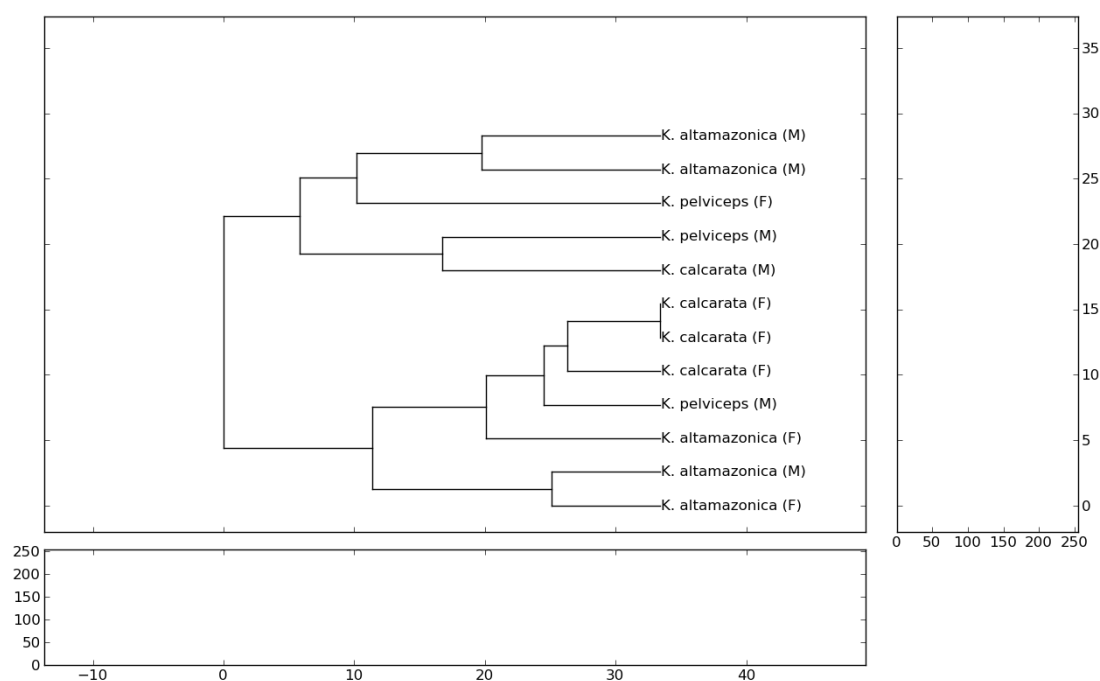


Figura 14. Fenograma gerado pela análise de UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*) com base na matriz de similaridade do padrão individual de bandas de proteínas de fêmeas (F) e machos (M) adultos de três espécies de *Kentropyx*.

Discussão

Fêmeas das três espécies de *Kentropyx* não apresentaram diferenças em relação ao seu comprimento rostro-cloacal, mas fêmeas de *K. pelviceps* apresentaram maior número de poros femorais do que as fêmeas de *K. altamazonica* e *K. calcarata*, que não apresentaram diferenças entre si. Essa diferença concorda com os dados obtidos em

ampla amostragem das espécies na Amazônia, indicando que o maior número de poros femorais é observado em *K. pelviceps* (ÁVILA-PIRES, 1995). O número de poros femorais pode ser apenas reflexo da história evolutiva da espécie, como pode também estar associado ao aumento da produção de secreção para contornar restrições das condições ambientais, ao tipo de substrato utilizado e/ou à importância das interações químicas na espécie (PINCHEIRA-DONOSO *et al.*, 2008; BAECKENS *et al.*, 2015; MARTÍN *et al.*, 2015a). As três espécies de *Kentropyx* estudadas neste capítulo fazem parte do mesmo grupo de espécies do gênero (WERNECK *et al.*, 2009; HARVEY *et al.*, 2012; GOICOECHEA *et al.*, 2016). Dados moleculares recentes (GOICOECHEA *et al.*, 2016) recuperam *K. pelviceps* como espécie irmã de *K. calcarata*, indicando que o maior número de poros femorais de *K. pelviceps* pode ter outras explicações que não apenas o compartilhamento da história evolutiva como ocorre com espécies de *Liolaemus*, que mesmo ocupando locais com condições climáticas discrepantes, apresentam número de poros vinculados a relações filogenéticas (PINCHEIRA-DONOSO *et al.*, 2008), embora não se possa excluir que essa diferença seja apenas reflexo de variação genética sem qualquer significado funcional (MARTÍN *et al.*, 2015a). As três espécies de *Kentropyx* podem ser observadas tanto no chão quanto em troncos e *K. pelviceps* parece ser observado com menos frequência em troncos ou mais próximos aos corpos de água do que as outras duas espécies (ÁVILA-PIRES, 1995). Em Lacertidae as espécies que passam maior tempo escalando troncos e arbustos tendem a apresentar menor número de poros femorais e uma das explicações possíveis é o acréscimo de um eixo vertical que pode potencializar o alcance das informações químicas (BAECKENS *et al.*, 2015). Se *K. calcarata* e *K. altamazonica* passam de fato mais tempo escalando troncos do que *K. pelviceps*, as diferenças no número de poros femorais das três espécies podem estar associadas com o uso de substrato.

Nas três espécies de *Kentropyx* foram identificados dezenas de compostos lipofílicos, indicando que apresentam composição lipofílica complexa com diversos compostos que são frequentemente identificados em secreções de glândulas femorais de lagartos (WELDON *et al.*, 2008). Embora o teste de PERMANOVA, com base em todos os compostos lipofílicos identificados, não tenha mostrado diferenças estatísticas entre as espécies, há compostos que foram encontrados exclusivamente em cada uma das espécies. Os resultados também sugerem que a composição dos compostos lipídicos é mais eficiente para diferenciar os machos de *K. pelviceps* e *K. altamazonica*, do que

para prever a espécie das fêmeas. A principal diferença entre os machos foi a grande quantidade de dois ésteres de elevado peso molecular em *K. pelviceps*, principalmente o derivado do ácido 9-Octadecenoico (oleico). Os ésteres de elevado peso molecular são compostos mais estáveis do que seus respectivos ácidos de origem, aumentando a durabilidade das marcações sob condições de elevadas temperaturas (BAECKENS *et al.*, 2017), como é o caso da Amazônia. Fêmeas de *Iberolacerta cyreni* (Lacertidae) são capazes de discriminar quantidades do ácido oleico e demonstram mais interesse para secreções de machos com maior quantidade do ácido (MARTÍN *et al.*, 2010b) e esse ácido também foi abundante em outras espécies de Teiinae estudadas neste trabalho. Considerando o discutido no parágrafo anterior sobre o uso de substrato, se as marcações de *K. pelviceps* forem principalmente no chão, a presença de grande quantidade desses ésteres pode auxiliar na durabilidade das marcações e, assim como seu ácido de origem, pode sinalizar características do macho que podem ser utilizadas pelas fêmeas para a escolha de parceiros.

Dados para a composição lipofílica de secreções de fêmeas são raros (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b) e todos os trabalhos sobre composição das secreções coletam material de indivíduos durante a estação reprodutiva, buscando por fêmeas que não apresentem evidência de cópula recente (cicatrices deixadas por machos). Para fêmeas de *Kentropyx* a evidência de cópula recente é um problema, uma vez que em *K. calcarata*, e provavelmente o mesmo ocorre nas demais espécies, machos não mordem as fêmeas durante a cópula (COSTA *et al.*, 2013). No entanto, a dissecação das fêmeas amostradas revelou que dentro de cada uma das espécies havia fêmeas não reprodutivas, fêmeas com folículos em vitelogênese secundária e fêmeas com ovos de diferentes tamanhos e o tamanho da amostra de cada uma dessas categorias era insuficiente para realizar comparações separando-as. Como observado para três espécies de *Ameivula* (CAPÍTULO 3) e para *Ameiva ameiva* (CAPÍTULO 1) o *status* reprodutivo dos indivíduos tem grande reflexo na composição lipídica das secreções femorais. A ampla variação reprodutiva nas fêmeas reduziu de forma significativa os compostos compartilhados por maior número de indivíduos para as análises estatísticas e este aspecto parece ter influenciado diretamente as nossas análises.

As proteínas presentes nas secreções femorais, além de atuarem como semioquímicos, podem promover uma liberação mais lenta dos compostos de menor

peso molecular e maior volatilidade (WYATT, 2014a e b). Ao contrário dos compostos lipofílicos, proteínas e peptídeos estão relacionadas a interações a curta distância, normalmente envolvendo contato (WYATT, 2010) e apresentam maior consistência ao longo do tempo, pois apresentam base genética (TOUHARA, 2008). O padrão de proteínas que observamos para as três espécies de *Kentropyx* não foi capaz de separar com clareza as espécies, mas parece revelar similaridades relacionadas ao sexo do indivíduo. Variações no padrão de bandas pode ser consequência de diferenças sexuais, populacionais e pode ser utilizada no reconhecimento sexual e específico (ALBERTS, 1993). Assim como para os compostos lipídicos, o *status* reprodutivo dos indivíduos amostrados neste capítulo podem estar interferindo nos resultados observados, mas de forma geral o padrão de proteínas de *Kentropyx* parece apresentar diferenças sexuais relativamente consistentes. Os indivíduos de *Kentropyx* podem acessar inicialmente uma série de informações distintas a respeito do emissor com base nos compostos lipídicos, que apresentam maior diversidade e volatilidade, e posteriormente obter confirmações das informações previamente obtidas com base nas informações proteicas.

Alguns aspectos gerais merecem destaque nas secreções das três espécies de *Kentropyx*. Machos e fêmeas das três espécies apresentaram esqualeno, podendo chegar a porcentagens realmente significativas (TIC > 17%), e que é conhecido por seu papel antioxidante e costuma ser encontrado em porcentagens mais elevadas em espécies que ocupam locais úmidos (GABIROT *et al.*, 2008; GARCÍA-ROA *et al.*, 2016a), como é o caso da Amazônia. Com exceção de uma fêmea de *K. pelviceps*, todos os indivíduos das três espécies apresentaram colesterol em sua secreção femoral, embora a quantidade do composto tenha apresentado ampla variação. A presença do colesterol em secreções femorais de Teiidae já foi discutida em detalhes nos capítulos anteriores e neste capítulo apresentamos mais três espécies da família nas quais o composto pode ser identificado, divergindo do exposto por MARTÍN e colaboradores (2011) para *Salvator merianae*. A função do colesterol em secreções de Teiidae ainda precisa ser explorada, uma vez que na literatura há diferentes funções já testadas como atuar como uma matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos, sinalização de tamanho e habilidade de luta etc. (MARTÍN & LÓPEZ, 2007; KHANNON *et al.*, 2011b). Alguns indivíduos apresentaram grandes quantidades de ácidos graxos de 16 e 18 carbonos, assim como seus respectivos ésteres etílicos. Os ácidos graxos são mais voláteis sob elevadas temperaturas, enquanto

seus respectivos ésteres são mais estáveis (BAECKENS *et al.*, 2017) e a variação entre essas duas classes de compostos nas três espécies de *Kentropyx*, assim como dentro da mesma espécie, precisa ser explorada com cuidado, uma vez que as condições gerais de temperatura e umidade são as mesmas para todos. Ao menos em machos, parece haver uma relação entre o aumento da quantidade de compostos odoríferos e redução da quantidade observada do cholest-4-en-3-one. Não há na literatura a função do cholest-4-en-3-one em lagartos, mas se sabe que este é um metabólito intestinal do colesterol e que em ratos está associado com a inibição do ganho de peso e acúmulo de corpos adiposos (SUZUKI *et al.*, 1998). Se o aumento dos compostos odoríferos estiver associado ao *status* reprodutivo, machos com maior quantidade deste esteroide podem estar acelerando seu consumo de reservas energéticas para entrar em atividade reprodutiva, quando então passam a secretar maiores quantidades de ácidos e ésteres.

Os dados obtidos para três espécies de *Kentropyx* revelaram a complexidade dos estudos de caracterização química de secreções femorais de lagartos, indicando que, além do sexo, das condições ambientais e da história evolutiva, o momento exato do ciclo reprodutivo de cada indivíduo parece ter grande influência na composição, dificultando a identificação das diferenças entre espécies. Esse aspecto parece ter importante influência nos futuros trabalhos realizados com espécies tropicais, como é o caso da grande maioria das espécies de lagartos no Brasil, que apresentam ciclo reprodutivo prolongado ou contínuo. Ao contrário do observado para os Lacertidae costumeiramente estudados, em lagartos brasileiros é possível que indivíduos de tamanho similar, coletados na mesma localidade e na mesma semana podem se encontrar em diferentes momentos do ciclo reprodutivo.

Conclusões

- Fêmeas de *Kentropyx pelviceps* apresentaram mais poros femorais do que *K. calcarata* e *K. altamazonica*. Essa diferença, embora possa ser apenas reflexo de variação genética sem explicações funcionais, também pode estar associada com o uso de substrato, uma vez que observações comportamentais sugerem que *K. pelviceps* passa mais tempo no chão do que as outras duas espécies.

- As três espécies apresentaram padrão complexo de compostos lipídicos e, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas, há compostos exclusivos de cada uma das espécies e o padrão de compostos lipofílicos parece ser mais efetivo para predizer a espécie quando comparamos machos do que quando comparamos fêmeas.
- A principal diferença entre machos de *K. pelviceps* e de *K. altamazonica* foi a grande quantidade de ésteres de elevado peso molecular na primeira. Esses ésteres podem aumentar a durabilidade das marcações no substrato e podem sinalizar características do macho emissor.
- Diferenças no *status* reprodutivo das fêmeas parece ter grande influência na composição das secreções, reduzindo o número de compostos compartilhados pela maioria e a qualidade das análises estatísticas.
- Observando de forma comparativa o padrão proteico das espécies de *Kentropyx* é possível reconhecer cada uma delas, porém a análise de similaridade mostra que as diferenças observadas são principalmente sexuais. As informações químicas presentes nas proteínas podem ser úteis em um contexto mais fino de confirmar algumas informações obtidas inicialmente através dos compostos lipídicos (mais voláteis).
- Nas três espécies foram observados com quantidades significativas de esqualeno, um antioxidante que pode proteger os semioquímicos sob condições de elevada umidade.
- As três espécies de *Kentropyx* apresentaram colesterol em suas secreções, reforçando a ideia de que este é sim um componente comum nas secreções de espécies de Teiidae.

Apêndice

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todas as fêmeas de *Kentropyx calcarata*. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC %). ♀1: MTR39877, CRC = 8,7 cm. ♀2: MTR39891, CRC = 8,8 cm. ♀3: MTR40957, CRC = 9,4 cm. ♀4: MTR40461, CRC = 8,6 cm.

Compostos	TIC (%)			
	♀1	♀2	♀3	♀4
2-Hexanona	0	0	0,14	0
Pentanol	0	0	0,22	0
Hexanal	0	0	2,47	0,19
Hexanol	0	0	0,22	0,15
2-Octenal	0	0	0,27	0
Nonenal	0	0	0,17	0
Nonanal	0,01	1,19	0,59	0
4-Decenal	0	0,34	0,21	0
Decanal	0	0,24	0,57	0
2-Undecenal	0	0	0,93	0
Ácido Decanóico	0	0	0,25	0
Etil Éster não identificado	0	0	0	0,19
Ácido Dodecanóico	0	0	0,28	0
Etil Éster do Ácido Dodecanóico	0	0,14	0	0
Ácido Tridecanóico	0	0	0,16	0
Pentadecanal	0	0	0	0,06
Ácido Tetradecanóico	0	0	0,97	0
Etil Éster do Ácido Tetradecanóico	0,12	0	0	0,1
Hexadecanal	0,14	0	0	0,15

Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	0	0,06	0	0
6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone				
Ácido graxo não identificado	0	0	0,06	0
Ácido Pentadecanóico	0	0	0,45	0
Ácido graxo não identificado	0	0	0,1	0
Ácido 9-Hexadecenóico	0	0	0,56	0
Ácido Hexadecanóico	0	0	13,33	0
Etil Éster do Ácido 9-Hexadecenóico	0,23	0	0	0,08
Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	9,51	0,29	0	2,2
Ácido Heptadecanóico	0	0	0,26	0
Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	0,51	0	0	0,29
Ácido 9,12-Octadecadienóico	0	0	8,37	0
Ácido 9-Octadecenóico	0	0	3,25	0
Ácido graxo não identificado de 18C	0	0	5,23	0
Ácido Octadecanóico	0	0	21,81	0
Hexadecanamida	0	0	0,08	0,14
Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	25,14	1,34	0	4,3
Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	20,71	1,05	0	2,41
Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	6,07	0	0	0,78
Etil Éster do Ácido Octadecanóico	23,08	1,38	0	4,72
Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	0,01	1,1	0	0
Metil Éster do Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenóico	0	0	0	0,3
Ácido Eicosanóico	0	0	0,18	0
Etil Éster do Ácido Eicosanóico	0	0	0	0,17
Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	0,76	0	0,5	0
4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,52	0	0	0
Éster não identificado do Ácido 10,13-Eicosadienóico	1,37	0	0	0

Éster não identificado do Ácido 13-Eicosenóico	1,26	0	0	0
Amida não identificada	0	0	0,07	0,22
Etil Éster do Ácido Docosanóico	0	0	0	0,47
Octadecanamida	0	0	0,07	0
Derivado do Cholest-5-en-3-ol	1,51	0,82	0	0
13-Docosenamida	0	26,39	0,14	0
Amida não identificada	0	1,68	0	0
Esqualeno	0	3,32	3,4	2,93
Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,29	0,76	0	0
Cholesta-4,6-dien-3-ol	0,27	0,26	0,22	4,47
Cholesta-3,5-diene	1,69	3,08	0,33	0
Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0	0	4,03	0
3-methoxy-Cholest-5-ene	0	0	2,79	0
Colesterol	1,44	10,01	21,24	40,66
Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0	3,59	0,37	0
Tocoferol não identificado	0,42	0	0	0
Desmosterol	0	0	3,07	14,98
Ergosta-5,7-dien-3-ol	0	0	0,66	7,44
Cholestan-3-one	0	2,75	0	0
Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	0	2,77	0	0
Cholesta-3,5-dien-7-one	0	3,02	0	0
Campesterol	0	0	0	3,31
Cholest-4-en-3-one	3,58	19,9	0,52	0
Cholesta-4,6-dien-3-one	1,36	11,86	0	0
Derivado do Ergosterol	0	1,62	0,54	0
Derivado do Cholest-8-en-3-ol	0	0	0,6	9,29
4-Campestene-3-one	0	1,04	0	0

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todos os indivíduos de *Kentropyx pelviceps*. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC %). ♀1: MTR41196, CRC = 7,2 cm. ♀2: MTR40830, CRC = 7,3 cm. ♀3: MTR41090, CRC = 8,1 cm. ♀4: MTR41471, CRC = 9,2 cm. ♀5: MTR40768, CRC = 9,2 cm. ♀6: MTR41011, CRC = 9,7 cm. ♀7: MTR36251, CRC = 10,3 cm. ♀8: MTR36185, CRC = 11,2 cm. ♂1: MTR36110, CRC = 10,7 cm. ♂2: MTR36108, CRC = 11,9 cm. ♂3: MTR36172, CRC = 12 cm.

Compostos	TIC (%)										
	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5	♀6	♀7	♀8	♂1	♂2	♂3
2-Hexanona	0	0,06	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0
Hexanal	0	0,13	13,71	0	0	2,54	0	0	0	0	2,48
2-Heptenal	0	0,24	0	0	0	0,28	0	0	0	0,38	1,7
Hexanol	0	0	1,37	0	2,39	0,05	0	0	0	0	0
2-Octenal	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0	0
Octenol	0	0	0	0	0	0	0	0,16	0	0	0
2,4-Nonadienal	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0	0,16	0,77
3-Octen-2-one	0	0	0,18	0	0	0,16	0,24	0,09	0	0	0,47
Nonenal	0	0	0	0	0	0	0	0,17	0	0	0,21
Nonanal	0,04	0	0	0,03	0	0,17	0,31	0,19	0,11	0,16	1,33
Etil Éster do Ácido 10-Undecenóico	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0,52
4-Decenal	0	0	0	0	0	0,06	0,21	0,09	0,29	0,14	0,39
Decanal	0,04	0,05	0	0	0	0	0,14	0	0	0,06	4,73
4-Tridecanona	0	0	0	0	0,27	0	0	0	0	0	0
2-Undecenal	0,06	0,1	0	0,13	0	0,85	0,66	0,78	0,34	0	1,14
2,4-Decadienal	0,03	0,29	0	0,13	0	0,52	0,27	0,21	0	0	0,93
2,4-Dodecadienal	0,09	0,31	0	0,16	0	0,74	0,32	0,41	0	0	0,95
Ácido Decanóico	0	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	1,01
Dodecanal	0	0	0	0,14	0	0,06	0	0	0	0	0,36

Esqualeno	15,98	1,26	4,86	0	6,29	1,46	0	2,69	0	4,08	0
Cholesta-2,4-diene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,64	0
Derivado do Cholesta-2,4-diene	0	0	0	0	0	0	0,57	0,68	1,54	0,96	0,76
Cholesta-4,6-dien-3-ol	4,28	0,11	7,55	5,46	8,79	1,02	7,25	6,53	7,19	6	2,34
Cholesta-3,5-diene	4,29	0	4,94	4,6	14,37	1,11	2,2	1,95	7,71	2,91	4,34
Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0	0	13,97	0	0	4,55	0	0	0	0	0
3-methoxy-Cholest-5-ene	0	0,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ -Tocoferol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02
Stigmasta-3,5-diene	15,47	0,56	0	15,71	0	0	0	0	0	0	0
Colesterol	43,27	0	26,97	41,04	37,31	4,04	65,14	21,57	6,43	13,02	6,88
α -Tocoferol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9
Ergosta-5,7-dien-3-ol	0	5,01	0	0	0	9,36	0,61	0	0	1,25	0
Cholesta-3,5-dien-7-one	0	0	0	0	15,23	0	2,89	6,15	5,39	9,22	0,92
Campesterol	14,34	0	0	11,34	0	0	0	1,37	0	0	0
Cholest-4-en-3-one	0	1,72	16,8	14,04	6,98	31,07	10,1	4,46	10,17	15,28	0
Cholesta-4,6-dien-3-one	0	0,13	0	0	0	2,57	7,65	4,8	6	8,89	0
Derivado do Ergosterol	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0
Derivado do Cholest-8-en-3-ol	0	0	0	0	0	0	0	0,89	0	0	0
Lanosterol	0	0	0	6,47	0	0	0	0	0	0	0
Hexadecanoic acid, hexadecyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	6,08	5,35	17,94
Stigmastanol	0	0	2,82	0	0	0	0	0	0	0	0
9-Octadecenoic acid, hexadecyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	47,19	24,12	6,09
Octadecanoic acid, hexadecyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,43	0

Lista dos compostos lipofílicos identificados em todos os indivíduos de *Kentropyx altamazonica*. Para cada composto é apresentado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC %). ♀1: MTR40408, CRC = 7,9 cm. ♀2: MTR40486, CRC = 8,5 cm. ♀3: MTR40717, CRC = 8,5 cm. ♀4: MTR40886, CRC = 8,6 cm. ♀5: MTR36299, CRC = 9,9 cm. ♂1: MTR40485, CRC = 7,8 cm. ♂2: MTR40501, CRC = 7,9 cm. ♂3: MTR40715, CRC = 8,7 cm. ♂4: MTR40767, CRC = 8,7 cm. ♂5: MTR40795, CRC = 9,1 cm.

Compostos	TIC (%)									
	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5
2-Hexanona	0	0,36	0	0	0	0	0	0,07	0	0
Hexanal	0	2,06	0	0,02	0	0	0	0	0	0
Hexanol	2,34	0,84	1,1	0,13	0	1,02	0	0,06	0,03	0,23
3-Octen-2-ona	0	0	0	0	0,08	0	0,03	0	0	0
Nonanal	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0
4-Decenal	0	0	0	0	0,03	0	0	0	0,02	0
Decanal	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0
2-Undecenal	0	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4-Decadienal	0	0,97	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Dodecanona	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0	0
Dodecanal	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0
Tetradecanal	0	0	0	0,09	0	0	0,01	0	0	0
Furanona não identificada	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0	0
Aldeído não identificado	0	0	0	0	0,61	0	0	0	0,02	0,11
Ácido Tridecanóico	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0	0
Pentadecanal	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0	0
Ácido Tetradecanóico	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0
Etil Éster do ÁcidoTetradecanóico	0	0	0	0	0,03	0	0	0,2	0	0
Hexadecanal	0	0	0	0,24	0,14	0	0,02	0,46	0,01	0
Hexadecanol	0	0	0	0,18	0	0	0	0,63	0	0

6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone	0	0	0	0	0	0	0,05	0,4	0	0,62
Heptadecanal	0	0	0	0	0,71	0	0	0	0	0
Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	1,9	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0,16
14-Methyl-8-Hexadecenal	0	0	0	0	0	0	0,05	0	0	0,22
Ácido 9-Hexadecenóico	0	0	0	0	0	0	0,33	0,23	0	0
Ácido Hexadecanóico	0	0	0	0,05	0	0	2,84	6,89	0	0,93
Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	1,8	0,19	19,76	0,13	0,87	7,41	0	0,02	0	1,32
Cetona não identificada	0	0	0	0	0	0	0,04	0	0	0
Octadecanal	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0
Ácido Heptadecanóico	0	0	0	0	0	0	0,09	0,21	0	0
Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	3,06	0	0,74	0	0,25	0	0	0	0	0
Aldeído não identificado	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0	0
Metil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13
Metil Éster do Ácido Octadecanóico	0	0	0	0,1	0	0	0,03	0	0	0,13
Ácido 9,12-Octadecadienóico	0	0	0	0	0	25,82	0	5,67	0	0
Ácido 9-Octadecenóico	0	0	0	0	0	17,61	27,01	2,05	0	0
Ácido graxo não identificado de 18C	0	0	0	0	0	0	0	1,18	0	0
Ácido Octadecanóico	0	0	0	0	0	0	13,82	3,47	0	0
Hexadecanamida	0	0,5	0	0,71	0	0	5,47	0,75	0	0
Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0	0,26	15,24	0,94	0	0	0	0	0	0
Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0	0,4	12,74	0,77	0	6,75	0	0	0	0,78
Éster não identificado do Ácido Octadecanóico	0	0	4,82	0,52	0	0	0	0	0	0
Etil Éster do Ácido Octadecanóico	3,08	0,19	9,72	0	0	13,54	0	0	0	0,62
Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	0	0	0	0	1,18	0	0	0	0	0
Metil Éster do Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenóico	0,23	0	0	0	0	0,83	0	0	0	0
Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0	0	0	0	1,15	0	0	0	0	0
Ácido 8,11,14-Eicosatrienóico	0	0	0	0	0	1,03	0	0	0	0

4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0
Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	0	0	0	0	0,96	0	0	0	0	0
Amida não identificada	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0	0
9-Octadecenamida	0	0,34	0	0,3	0	0	1,44	0,29	0	0
Aldeído não identificado	0	0	0	0,57	0	0	0	0	0	0
Octadecanamida	0	0,49	0	0,05	0	0	1,31	0,32	0	0
Derivado do Cholest-5-en-3-ol	0	0	0,55	0	1,71	0	0,05	0	0	0
13-Docosenamida	0	0,47	0	0	17,88	0	0	0	0	0
Esqualeno	6,95	5,83	2,31	2,95	19,61	4,77	5,69	0,54	0	2,58
Derivado do Cholesta-2,4-diene	0	0	1,98	0	0	0,76	0	0	0	0,38
Cholesta-4,6-dien-3-ol	2,72	2,23	2,53	3,49	4,83	0,59	0,14	0,14	3,4	0,73
Cholesta-3,5-diene	3,68	1,38	4,64	17,63	2,44	1,57	0,36	0,16	2,64	1,43
Ergosta-4,6,22-triene	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0	0
Unidentified steroid (105, 155, 197, 251, 376)	0	0	0	0	0	0	0,28	0,5	0	0,35
Derivado do Ergost-5-en-3-ol	0	0	0	0	0	0	0,15	0	0	0,71
3-methoxy-Cholest-5-ene	10,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-Tocoferol	0	0	0	0	0	0	0,11	0	0	0
Stigmasta-3,5-diene	0	0	0	0	0	0,13	0,09	0	0	0
Colesterol	32,27	62,73	11,59	45,17	21,11	11,09	19,15	43,83	15,48	16,38
9-Hexadecenoic acid, octadecyl ester	0	0	0	0	2,12	0	0	0	0	0
Desmosterol	0	0	0	0	0	0	0	0	9,39	0
Ergosta-5,7-dien-3-ol	0	0	0	0	0	0	2,88	4,72	15,12	3,98
Cholestan-3-one	0	0	0	8,49	0	0	0	0	0	0
Ergosterol	0	0	0	0	0	0	0	3,28	0	0
Cholesta-3,5-dien-7-one	0	0	0	0	4,95	0	0	0	0	0
Campesterol	0	0,98	0	0	0,64	2,05	3,08	9,88	10,26	3,17
Cholest-4-en-3-one	25,24	14,11	11,91	17,33	8,88	3,11	3,62	8,84	20,1	49,25

Cholesta-4,6-dien-3-one	0	4,87	0	0	7,03	1,92	0,6	0,65	0	0,94
2,4-Cholestadien-1-one	0	0	0	0	0	0	1,49	0	0	2,51
Derivado do Ergosterol	0	0	0	0	0	0	0	0,72	9,48	0
Derivado do Cholest-8-en-3-ol	4,47	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lanost-8-en-3-ol	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0
Lanosta-8,24-dien-3-one	0	0	0	0	0	0	0,45	0,37	3,27	0
γ -Sitosterol	0	0	0	0	0	0	0,29	0,79	0	0
Lanosterol	2,16	0	0	0	0	0	5,45	0	0	0
Stigmasterol derivated	0	0	0	0	0	0	0,46	0	0	0
Hexadecanoic acid, hexadecyl ester	0	0	0	0	0,53	0	0	0,31	0	0
4-Campestene-3-one	0	0	0	0	0	0	1,34	1,82	10,67	0
Stigmastanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,56
Cholest-4-ene-3,6-dione	0	0	0	0	0	0	1,47	0,32	0	3,9
Derivado do Cholest-4-en-3-one	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,88
9-Hexadecenoic acid, eicosyl ester	0	0	0	0	0,72	0	0	0	0	0
Octadecanoic acid, hexadecyl ester	0	0	0	0	1,44	0	0	0	0	0

Capítulo 5

Dados preliminares sobre a composição química da secreção de glândulas femorais e pré-anais de espécies de Teiidae e Gymnophthalmidae (Squamata)

Abstract. Chemical signaling plays an important role in the social and reproductive behavior of Squamata. The femoral and preanal glands are the main sources of semiochemicals in lizards and there are data of their chemical composition and function for some species of few families. Teiidae and Gymnophthalmidae are two families of neotropical lizards that represent a significant portion of the diversity of Brazilian lizards and for which there is scarcity of information about their chemical interactions. Preliminary data for *Tupinambis teguixin*, *Cnemidophorus lemniscatus*, *Crocodilurus amazonicus*, *Neusticurus medemi*, *Iphisa elegans*, *Riolama sp. nov.*, *Leposoma puk*, *L. scincoides* and *Loxopholis snethlageae* resulted in 102 lipophilic compounds identified in the Gymnophthalmidae and 58 in the Teiidae species. No two species with the same pattern of lipophilic compounds or identical proteins were found, neither individuals of the same species, indicating that this type of information may be useful to separate and/or identify species in both families and understanding social interactions. Some lipidic compounds proved to be strong candidates to more detailed studies of their functions in chemical interactions of neotropical lizards.

Keywords. Chemical signaling, lipophilic compounds, Gymnophthalmoideae, proteins.

Resumo. A sinalização química desempenha um importante papel nos comportamentos sociais e reprodutivos dos Squamata. As glândulas femorais e pré-anais são as principais fontes de semioquímicos em lagartos e há dados sobre sua composição química e função para algumas espécies de poucas famílias. Teiidae e Gymnophthalmidae são duas famílias de lagartos neotropicais que representam parcela significativa da diversidade de lagartos brasileiros e para as quais há escassez de informações acerca de suas interações químicas. Neste capítulo foram gerados dados

preliminares sobre a composição química das secreções de *Tupinambis teguixin*, *Cnemidophorus lemniscatus*, *Crocodilurus amazonicus*, *Neusticurus medemi*, *Iphisa elegans*, *Riolama sp. nov.*, *Leposoma puk*, *L. scincoides* e *Loxopholis snethlageae*. No total, foram identificados 102 compostos lipofílicos nas espécies de Gymnophthalmidae e 58 em Teiidae. Não foram observadas duas espécies com padrão idêntico de compostos lipofílicos ou de proteínas idênticos, nem mesmo dois indivíduos da mesma espécie, indicando que este tipo de informação pode ser útil para separar e/ou identificar espécies nas duas famílias e na compreensão de interações sociais. Alguns compostos lipídicos se mostraram fortes candidatos para estudos mais detalhados sobre sua função em interações químicas em lagartos neotropicais.

Palavras-chave. Compostos lipofílicos, Gymnophthalmoideae, proteínas, sinalização química.

Introdução

A sinalização química é mediada por compostos químicos genericamente chamados de semioquímicos (WYATT, 2014b). As glândulas femorais e pré-anais são as principais fontes de semioquímicos em lagartos e sua secreção é composta por proteínas e lipídios (ALBERTS, 1990). A produção da secreção é influenciada por hormônios andrógenos e é mais intensa durante a estação reprodutiva e, geralmente, machos apresentam maior número de glândulas ou maior atividade de produção da secreção (COLE, 1966). A composição química dessas secreções já foi estudada para algumas espécies de poucas famílias de lagartos (WELDON *et al.*, 2008) e há dados que indicam que as secreções contêm informações químicas utilizadas na escolha de parceiros (JOHANSSON & JONES, 2007; MASON & PARKER, 2010; GABIROT *et al.*, 2013), para acessar a habilidade de luta ou *status* de dominância entre machos (LÓPEZ & MARTÍN, 2002; KHANNOON *et al.*, 2011b) e para acessar informações de sexo, idade e saúde do emissor (MARTÍN & LÓPEZ, 2006b; MARTÍN *et al.*, 2007; KHANNOON *et al.*, 2011a; MARTÍN & LÓPEZ, 2015). Estudos indicam a importância de se conhecer a composição química da secreção de glândulas femorais e pré-anais para um maior número de espécies de famílias distintas para que se possam realizar trabalhos mais abrangentes que permitam compreender aspectos da história evolutiva e

do papel das secreções em diferentes contextos sociais de lagartos (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010; BAECKENS *et al.*, 2015 e 2017). As informações presentes na literatura sobre a composição química de glândulas femorais e pré-anais são, principalmente, para espécies do velho mundo.

Teiidae e Gymnophthalmidae são duas famílias de lagartos neotropicais com relação de parentesco reconhecida há décadas pela morfologia e que vem sendo corroborada por dados moleculares (PELLEGRINO *et al.*, 2001; GOICOECHEA *et al.*, 2016). As duas famílias somam 411 espécies no Novo Mundo e 137 ocorrem no Brasil, correspondendo a aproximadamente 48% da diversidade de lagartos brasileiros (UETZ *et al.*, 2019). Os Teiidae são lagartos de médio a grande porte (entre 7 e 50 cm de comprimento rostro-cloacal) primariamente terrestres; os Gymnophthalmidae são pequenos (entre 4 e 15 cm de comprimento rostro cloacal) que incluem espécies terrestres, fossoriais, semi-aquáticas e semi-arborícolas (PIANKA & VITT, 2003). Historicamente as duas famílias foram posicionadas dentro dos Scleroglossa, agrupamento reconhecido por um desenvolvido órgão vomeronasal e por se orientar, principalmente, por meio de sinais químicos (COOPER JR., 1996). Atualmente fazem parte dos Laterata, um grupo monofilético que inclui os Teiioidea (Teiidae + Alopoglossidae + Gymnophthalmidae), irmão dos Lacertidae + Amphisbaenia (GOICOECHEA *et al.*, 2016).

Estudos sobre a composição química das secreções femorais e pré-anais para espécies neotropicais são escassos, sendo ainda mais raros para Teiidae e, até onde sabemos, inexistentes para os Gymnophthalmidae. Para os Teiidae foi realizada a caracterização da composição química da secreção das glândulas femorais de *Salvator merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011). Embora não existam dados publicados para os Gymnophthalmidae, acredita-se que apresentem capacidade de discriminar itens alimentares com base em sinais químicos (COOPER JR. *et al.*, 2002) e um pequeno experimento realizado em campo (dados não publicados) indica que machos de *Vanzosaura multiscutata* são capazes de discriminar entre controle (água destilada) e a secreção femoral de outros machos.

As duas famílias são ótimos modelos para este tipo de estudo, compartilham significativas similaridades com os Lacertidae (PIANKA & VITT, 2003), grupo mais bem estudado de lagartos sob o ponto de vista das interações químicas (BAECKENS *et*

al., 2015 e 2017), e apresentam particularidades interessantes para serem abordadas do ponto de vista químico. Machos e fêmeas de Teiidae em sua maioria apresentam glândulas femorais e pré-anais e apresentam taxonomia e sistemática complexa, com espécies híbridas (ÁVILA-PIRES, 1995). Os Gymnophthalmidae apresentam complexos crípticos de espécies (NUNES *et al.*, 2012) e espécies fossoriais para as quais acredita-se que a orientação química seja essencial.

Neste capítulo são apresentados dados preliminares da composição química das secreções de glândulas femorais/pré-anais para três espécies de Teiidae (*Tupinambis teguixin*, *Cnemidophorus lemniscatus* e *Crocodilurus amazonicus*) e para seis espécies de Gymnophthalmidae (*Neusticurus medemi*, *Riolama sp. nov.*, *Iphisa elegans*, *Leposoma puk*, *L. scincoides* e *Loxopholis snethlageae*). Os resultados apresentados neste capítulo serão retomados na DISCUSSÃO GERAL quando serão comparados com os dados obtidos para as outras espécies de Teiidae estudadas nos capítulos anteriores. Embora essas espécies estejam aqui representadas por um baixo número de indivíduos, os resultados obtidos indicam o potencial das informações químicas dessas secreções para melhor compreender aspectos da evolução e separação de linhagens das duas famílias e podem incentivar novos pesquisadores a trabalharem com um tema que vem sendo negligenciado por herpetólogos brasileiros.

Materiais e Métodos

A **Tabela 1** apresenta todos os indivíduos para os quais foram obtidas amostras com número de campo (MTR), sexo, localidade de coleta e técnica de análise química aplicada (cromatografia gasosa e espectrometria de massas e/ou eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE). Para todos os indivíduos foi tomada a medida do comprimento rostro-cloacal (CRC) e a sexagem foi realizada através da inspeção das gônadas. A extração das secreções, sua preparação e a realização das análises químicas seguiram o exposto na METODOLOGIA GERAL.

Tabela 1. Lista dos espécimes amostrados neste capítulo. Para cada indivíduo é apresentado o número de registro de campo (MTR), a localidade na qual foi obtido, o sexo e por qual metodologia foi analisada sua secreção. CG: cromatografia gasosa e espectrometria de massas. GEL: eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Espécie	MTR	localidade	sexo	CG	GEL
<i>Cnemidophorus lemniscatus</i>	41519	Temendauí, Rio Negro, AM	M	X	X
	41508	Temendauí, Rio Negro, AM	M	X	X
<i>Crocodylurus amazonicus</i>	40911	Cacauali, Rio Negro, AM	F	X	X
	41560	Pedreira, Rio Negro, AM	J	X	X
<i>Tupinambis teguixin</i>	36321	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	M	-	X
	40108	Pico da Neblina, AM	F	X	X
	36036	Cuiauá, Rio Içá, AM	M	X	X
	39852	Maturacá, Pico da Neblina, AM	J	X	X
<i>Iphisa</i>	36228	Açai, Rio Içá, AM	M	X	X
	36243	Cuiauá, Rio Içá, AM	M	X	X
	36599	São Pedro, Rio Içá, AM	M	X	X
<i>Leposoma puk</i>	38661	P.N. Alto Cariri, BA	M	X	-
	38630	P.N. Alto Cariri, BA	M	X	-
<i>Leposoma scincoides</i>	38656	P.N. Alto Cariri, BA	M	X	-
	38791	P.N. Alto Cariri, BA	M	X	-
	38794	P.N. Alto Cariri, BA	M	X	-
	38796	P.N. Alto Cariri, BA	M	X	-
	35965	Região do Rio Içá, AM	M	X	-
<i>Loxopholis snethlageae</i>	36025	Região do Rio Içá, AM	M	X	-
	36019	Cuiauá, Rio Içá, AM	M	X	-
	36100	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	M	X	-
	36641	São Pedro, Rio Içá, AM	M	X	-
<i>Neusticurus medemi</i>	36272	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	M	X	X
	35958	Cachoeirinha, Rio Içá, AM	M	X	X
<i>Riolama sp. nov. a.</i>	40314	Bacia do Gelo, Pico da Neblina, AM	M	X	X
	40320	Bacia do Gelo, Pico da Neblina, AM	M	X	X

Resultados e Discussão

Gymnophthalmidae

Neusticurus medemi

Neusticurus é um gênero que reúne espécies semi-aquáticas que ocorrem no norte da América do Sul a leste dos Andes (ÁVILA-PIRES, 1995) para as quais há pouca literatura sobre seus aspectos ecológicos (VITT & ÁVILA-PIRES, 1998). *Neusticurus medemi* (**Figura 1**) é uma espécie de distribuição restrita a algumas localidades na Amazônia, cujas fêmeas também apresentam poros femorais (MARQUES-SOUZA *et al.*, 2018).



Figura 1. Macho adulto de *Neusticurus medemi*. Foto: Mauro Teixeira Jr.

Foram identificados 43 compostos lipofílicos em *N. medemi* (**Tabela 2**): um aldeído, um ácido graxo, uma cetona, uma amida, esqualeno, 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide, duas formas do tocoferol, seis ésteres de ácidos graxos e 29 esteroides. O ♂1 (MTR36272) apresentou 42 compostos lipídicos, 10 desses compostos não foram identificados no outro macho e representaram apenas 1,68% da secreção. No ♂1 os 28 esteroides identificados corresponderam a 83,57% da secreção e as duas formas do tocoferol a 16,07%. O ♂2 (MTR35958) apresentou 33 compostos lipofílicos e um composto exclusivo (colestanol) representando 5,99% da secreção. No ♂2 os 28 esteroides identificados corresponderam a 90,86% da secreção e as duas formas do tocoferol a 8,88%.

Entre os compostos com função odorífera, foram identificados oito no ♂1 e três no ♂2, porém quando comparada a porcentagem dessas classes de compostos em cada indivíduo, o ♂1 soma TIC = 0,23% e o ♂2, TIC = 0,26%. Quando observamos os nove compostos que correspondem a maior porcentagem da secreção (> 70%) (**Figura 2**), notamos que as maiores diferenças entre os dois machos foram as quantidades de colesterol, colestanol e α -Tocoferol. O α -Tocoferol pode indicar a qualidade da dieta do indivíduo e apresentar significativa variação (WELDON *et al.*, 2008; MARTÍN & LÓPEZ, 2010a). O ♂1, de maior tamanho corporal, apresentou aproximadamente o

dobro de α -Tocoferol do que o ♂2, mas mais indivíduos precisam ser amostrados para que se possa avaliar a potencial função do composto em *Neusticurus medemi*.

Tabela 2. Compostos lipofílicos identificados em duas amostras de secreções de machos adultos de *Neusticurus medemi*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) em cada indivíduo. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. ♂1: MTR36272 e ♂2: MTR35958.

TR	Compostos	TIC (%)	
		♂1	♂2
31.0	Hexadecanal	0,02	-
31.6	6,10,14-Trimetil-2-Pentadecanona	0,01	-
33.2	Metil éster do Ácido Hexadecanóico	0,01	-
33.9	Ácido Hexadecanóico	0,02	-
34.6	Etil éster do Ácido Hexadecanóico	0,01	0,05
36.9	Metil éster do Ácido Octadecanóico	0,01	-
37.7	Etil éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,03	0,17
38.2	Etil éster do Ácido Octadecanóico	0,01	0,04
40.9	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,01	-
47.1	Cholest-5-en-3-ol	0,02	0,06
47.3	13-Docosenamida	0,06	-
47.5	Cholest-3-ene	0,17	0,64
47.9	Cholest-2-ene	0,07	0,46
48.0	Esqualeno	0,05	-
48.2	Cholest-4-ene	0,04	0,25
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,04	0,09
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	0,09	0,17
49.0	Cholesta-3,5-diene	0,22	0,41
49.6	Ergosta-4,6,22-triene	0,06	0,31
50.1	Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	0,12	-
50.4	Esteróide não identificado (145, 159, 237, 362, 382)	0,13	0,38
50.5	Esteróide não identificado (203, 257, 344, 383, 398)	0,1	0,13
51.0	γ -Tocoferol	0,37	0,2
51.4	Derivado do Cholestan-3-ol	4	1,72
51.6	Stigmasta-3,5-diene	0,08	0,79
51.9	Colesterol	21,48	14,26
52.0	Colestanol	-	5,99
52.1	α -Tocoferol	15,7	8,68
52.5	Cholestan-3-one	7,73	5,33
52.8	Ergostanol	1,33	-
53.1	Desmosterol	3,25	2,16

53.3	Campesterol	8,07	8,58
53.4	Derivado do Ergostanol	1,87	1,93
53.6	Cholest-4-en-3-one	2,31	4,35
53.7	Stigmasterol	2,31	2,58
54.0	γ -Ergostenol	5,54	8,73
54.2	Ergosta-4,22-dien-3-one	0,83	1,04
54.5	γ -Sitosterol	9,8	11,28
54.7	Derivado do Stigmastanol	5,89	7,38
55.1	4-Campestene-3-one	0,86	2,12
55.3	Stigmast-7-en-3-ol	5,31	6,19
55.9	Esteróide não identificado (229, 271, 397, 412)	1,13	1,45
56.6	γ -Sitostenone	0,84	2,09

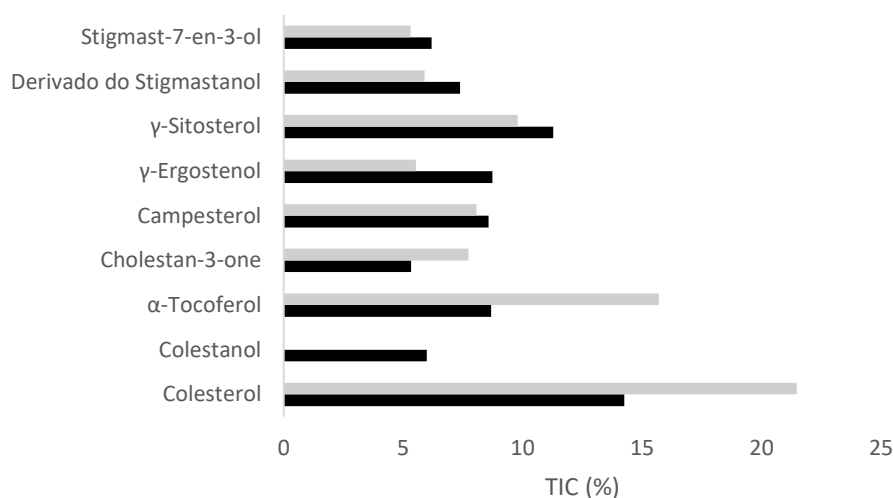


Figura 2. Representação da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos nove compostos lipofílicos mais abundantes em machos adultos de *Neusticurus medemi*. Cinza: ♂1 que apresentou 42 compostos lipídicos no total. Preto: ♂2 que apresentou 33 compostos lipídicos no total.

O colesterol foi o composto mais abundante nas duas amostras, mas o ♂2 apresentou dois terços da quantidade apresentada pelo ♂1. O colesterol tem sido apontado como o esteroide mais abundante nas secreções da maior parte das espécies de lagartos (WELDON *et al.*, 2008) e sua principal função é a de agir como uma matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos (ESCOBAR *et al.*, 2003), porém parece sinalizar força entre machos de *Acanthodactylus boskianus* (Lacertidae) (KHANNOON *et al.*, 2011b). Os dois machos apresentaram quantidades similares de campesterol, esteroide de origem vegetal que pode estar relacionado com informações sobre a dieta do indivíduo, assim como sinalizar idade/tamanho (MARTÍN & LÓPEZ, 2006b e c; WELDON *et al.*, 2008; MARTÍN & LÓPEZ, 2015). Seria interessante verificar a quantidade de colesterol e campesterol em mais machos de *N. medemi* de diferentes

tamanhos corporais, assim como obter informações de dieta, para avaliar se os compostos desempenham na espécie as mesmas funções já relatadas na literatura.

O γ -Sitosterol já foi identificado em outras espécies de lagartos e parece sinalizar idade/tamanho em algumas espécies de Squamata (WELDON *et al.*, 2008), mas aqui foi observado em maior quantidade no macho de menor CRC. O cholestan-3-one é um esteroide relativamente instável e volátil, especialmente em locais de elevadas temperaturas (LIDE & MILNE, 1993). Grandes quantidades de cholestan-3-one foram observadas em *Uromastix aegyptia* (Agamidae), que habita áreas de deserto, para a qual se acredita que a secreção não tenha função significativa sobre o solo, mas sim dentro dos túneis nos quais os indivíduos passam parte do tempo e que apresentam temperaturas bem mais amenas do que as observadas na superfície (MARTÍN *et al.*, 2016b). Assim como para *U. aegyptia*, o comportamento de *N. medemi* pode potencialmente explicar as grandes quantidades de cholestan-3-one, embora a espécie ocorra na Amazônia onde as temperaturas são elevadas, os indivíduos passam grande parte do tempo em contato com corpos d'água e substratos que podem apresentar temperaturas mais amenas garantindo maior estabilidade das marcações químicas.

Riolama sp. nov.

Riolama é um gênero basal de Gymnophthalmidae (GOICOECHEA *et al.*, 2016) com quatro espécies formalmente descritas (UETZ *et al.*, 2019) que ocorrem na região oeste do escudo das Guianas no norte da América do Sul e para as quais há poucas informações na literatura (KOK, 2015). *Riolama sp. nov.* (**Figura 3**) representa uma das espécies novas que foram coletadas pelo Laboratório de Herpetologia do IBUSP durante uma expedição para a região do Pico da Neblina, Amazonas, e que está sendo formalmente descrita por RECODER e colaboradores.

Em *Riolama sp. nov.* foram identificados 42 compostos lipídicos (**Tabela 3**): três aldeídos, 16 ésteres de ácidos graxos, três formas do tocoferol, 15 esteroides, esqualeno, uma cetona, um álcool, uma amida e o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide. No ♂1 foram identificados 39 compostos lipofílicos e 13 destes compostos, que representaram 1,97% da secreção, não foram identificados no ♂2. O ♂2 apresentou 30 compostos lipofílicos, sendo três compostos exclusivos que representaram apenas

0,44% da secreção. Os três compostos exclusivos do ♂2 foram detectados no ♂1, porém com TIC igual a zero (composto detectável, porém não quantificável) e por essa razão não foram contabilizados no total de compostos do ♂1.



Figura 3. Macho adulto de *Riolama sp. nov.* Foto: Renato Recoder.

Tabela 3. Compostos lipofílicos identificados em duas amostras de secreções de machos adultos de *Riolama sp. nov.* Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) em cada indivíduo. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as formas da IUPAC. ♂1: MTR40314 e ♂2: MTR40320.

TR	Compostos	TIC (%)	
		♂1	♂2
28.9	Pentadecanal	0,1	-
31.0	Hexadecanal	0,08	-
31.6	6,10,14-Trimetil-2-Pentadecanona	0,07	-
33.2	Metil éster do Ácido Hexadecanóico	0,03	-
34.5	Etil éster do Ácido Hexadecanóico	-	0,1
35.0	Octadecanal	0,25	0,14
36.2	Nonadecanol	2,55	1,41
36.5	Metil éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,12	-
37.0	Metil éster do Ácido Octadecanóico	0,2	-
37.6	Etil éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	-	0,11
37.7	Etil éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,01	0,66
38.2	Etil éster do Ácido Octadecanóico	-	0,23
39.1	Éster não identificado do Ácido Hexadecanóico	0,08	-
39.9	Hexadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,29	0,01
40.9	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0,04	-
41.4	Amida não identificada	0,16	-
42.0	9,12-Octadecadienoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester	0,09	-
42.1	9-Octadecenoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester	0,22	0,02
42.8	9-Octadecenoic acid, oxironylmethyl ester	0,35	-
43.2	Octadecanoic acid, oxironylmethyl ester	0,18	-
47.5	Cholest-3-ene	1,02	0,88

48.0	Esqualeno	0,47	-
48.1	Cholesta-2,4-diene	0,38	0,51
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	1,12	1,56
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	0,95	1,13
48.9	Cholesta-3,5-diene	3,48	4,56
49.3	Esteróide não identificado (155, 197, 209, 251, 349, 364)	5,52	2,69
49.4	Esteróide não identificado (199, 253, 351, 366)	0,64	0,26
49.7	Esteróide não identificado (143, 158, 253, 366)	2,66	1,12
50.8	Tocoferol não identificado	0,3	0,27
51.0	γ -Tocoferol	1,44	0,4
51.4	Derivado do Cholestan-3-ol	5,07	1,23
51.9	Colesterol	20,14	23,18
52.0	α -Tocoferol	6,01	6,43
52.4	Cholesta-5,7-dien-3-ol	12,93	5,62
53.2	Campesterol	1,51	1,51
53.5	Cholest-4-en-3-one	5,79	3,4
53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	1,97	2,06
54.1	Lanost-8-en-3-ol	4,02	4,31
58.5	Hexadecanoic acid, eicosyl ester	2,48	2,87
63.1	9-Octadecenoic acid, hexadecyl ester	10,18	26,55
63.6	Éster do Ácido Octadecanóico (285, 537)	7,1	6,77

Nos dois machos de *Riolama sp. nov.* ésteres de ácidos graxos, esteróides e as três formas do tocoferol representaram a quase totalidade da composição da secreção (σ^1 : TIC = 96,28%; σ^2 : TIC = 98,44%). Os dois machos apresentaram diferenças significativas apenas na porcentagem relativa de ésteres e esteróides, com o macho de maior CRC (σ^2) apresentando maior quantidade de ésteres (compostos odoríferos) e menor quantidade de esteróides. O aumento da porcentagem dos compostos odoríferos torna a secreção mais volátil, aumentando o alcance das informações químicas (BAECKENS *et al.*, 2015 e 2017). Observando oito dos compostos lipídicos mais abundantes, representando 71,24% da secreção do σ^1 e 77,49% da secreção do σ^2 , as diferenças mais marcantes entre as duas amostras ficam bastante evidentes (**Figura 4**).

O colesterol representou aproximadamente um quinto da secreção na espécie não parecendo apresentar uma relação significativa com o CRC dos machos e provavelmente sua função não está relacionada com sinalizar diferenças em idade, tamanho e habilidade de luta, porém mais amostras são necessárias para confirmar essa hipótese. Os dois machos também apresentaram quantidades bastante similares de outros esteróides como, por exemplo, o cholesta-4,6-dien-3-one, campesterol e lanost-

8-en-3-ol. Os dois machos apresentaram quantidades similares de α -Tocoferol (TIC: ♂1 = 6,01% e ♂2 = 6,43%), mas o ♂1 apresentou maiores quantidades de cholesta-5,7-dien-3-ol (TIC: ♂1 = 12,93% e ♂2 = 5,62%). O cholesta-5,7-dien-3-ol é precursor de vitamina D₃, parece sinalizar a qualidade do emissor e aumenta a atratividade de machos em *Iberolacerta monticola* (Lacertidae) (MARTÍN & LÓPEZ, 2006c) tendo relação significativa com a qualidade do sistema imune e simetria na espécie (LÓPEZ *et al.*, 2005), sinaliza idade em *Acanthodactylus erythrurus* (LÓPEZ & MARTÍN, 2005a), mas não provocou alterações de comportamento em machos de *A. boskianus* (KHANNOON *et al.*, 2011b). Se o cholesta-5,7-dien-3-ol indica alguma característica de maior qualidade nos machos de *Riolama sp. nov.*, essa qualidade provavelmente não está relacionada com tamanho corporal, uma vez que o ♂1 é justamente o de menor CRC, mas podem estar relacionadas com diferenças na dieta ou em características do sistema imune.

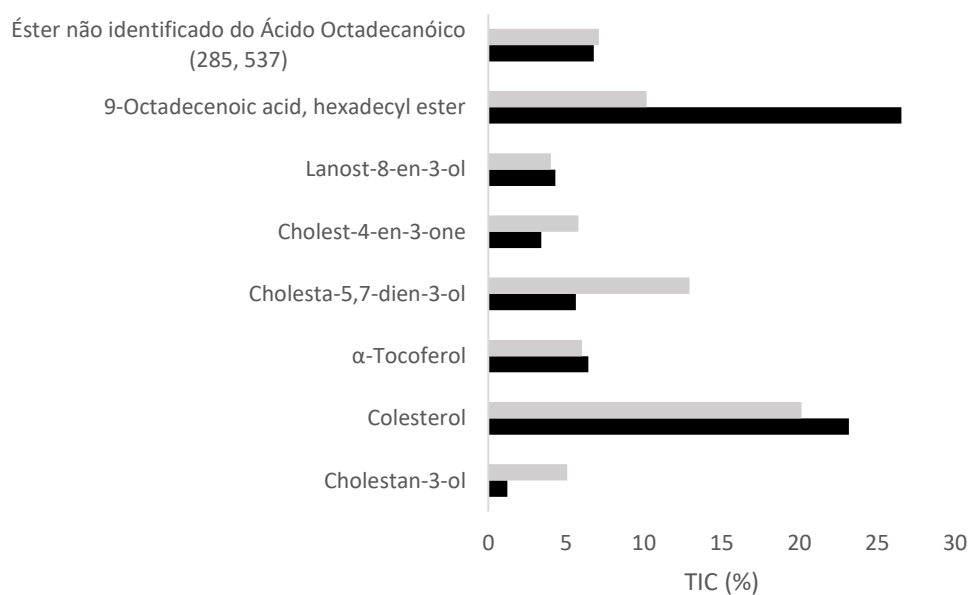


Figura 4 Representação da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos oito compostos lipofílicos mais abundantes em machos adultos de *Riolama sp. nov.* Cinza: ♂1 que apresentou 39 compostos lipídicos no total. Preto: ♂2 que apresentou 30 compostos lipídicos no total.

A característica mais marcante da secreção de *Riolama sp. nov.* foi a presença de três ésteres de alto peso molecular, dois deles em quantidades realmente elevadas (**Figura 4**) e não há na literatura informações sobre a função exata desses três ésteres em secreções femorais de lagartos. Em um amplo trabalho avaliando a relação entre as condições ambientais e a composição da secreção em lagartos da família Lacertidae (BAECKENS *et al.*, 2017) foi observado que espécies de ambientes xéricos apresentam

maiores quantidades de álcoois de elevado peso molecular e ésteres de ácidos graxos e espécies de ambientes méxicos apresentam maiores quantidade de álcoois de baixo peso molecular e aldeídos. Pelas características dessas classes de compostos, BAECKENS e colaboradores (2017) apresentam a hipótese de que as espécies de clima xérico direcionam mais dardejadas para o solo, onde as marcações estariam presentes pela estabilidade dos compostos químicos e as espécies de clima méxico direcionam mais dardejadas para o ar pela volatilidade dos álcoois de baixo peso molecular e aldeídos. *Riolama sp. nov.* é uma espécie da Amazônia, com clima mais próximo ao considerado méxico por BAECKENS e colaboradores (2017), que anda por entre o folhiço e troncos caídos. Não há informações se indivíduos do gênero direcionam mais dardejadas para o solo ou para o ar, mas levando em consideração o seu tamanho e o fato de viverem escondidos sob o folhiço, é possível que para *Riolama* seja mais eficazes marcações persistentes no solo do que marcações mais voláteis.

Iphisa elegans

Iphisa elegans (**Figura 5**) é a única espécie formalmente descrita no gênero (UETZ *et al.*, 2019) e vive sob o folhiço em áreas de floresta da Amazônia. Dados moleculares e de morfologia do hemipênis indicam a existência de um complexo críptico de espécies (NUNES *et al.*, 2012). As amostras obtidas correspondem à potencialmente duas espécies que ocupam margens distintas do Rio Içá na Amazônia. Dois machos foram coletados na margem esquerda do Rio Içá e um na margem direita.



Figura 5. Macho adulto de *Iphisa elegans*. Foto: Mauro Teixeira Jr.

Foram identificados 45 compostos lipofílicos (**Tabela 4**): 17 aldeídos, quatro álcoois, 21 esteroides, o esqualeno, uma cetona e uma amida. Nas duas amostras da margem esquerda foram identificados 35 compostos no total, 32 no ♂1 (MTR36228) e

28 no ♂2 (MTR36243). Na margem direita foram identificados 38 compostos no ♂3 (MTR36599). Sete compostos foram observados apenas nas amostras da margem esquerda, três aldeídos (♂1: TIC = 0,58%, ♂2: TIC = 0,45%), um álcool (♂1: TIC = 1,88%, ♂2: TIC = 1,12%) e três esteroides (♂1: TIC = 4,81%, ♂2: TIC = 3,24%). Dez compostos foram observados apenas no macho da margem direita (♂3), cinco aldeídos (TIC = 0,59%), dois álcoois (TIC = 5,7%) e três esteroides (TIC = 5,23%). Os dois machos da margem esquerda apresentaram composição similar, porém distinta da do indivíduo da margem direita. Os esteroides representaram 68,69% da secreção do macho da margem direita e 88,15% da secreção dos machos da margem esquerda, os álcoois representaram 5,75% da secreção da margem esquerda e 10,98% da margem direita. A 13-Docosenamida representou 17,33% da secreção do macho da margem direita, mas foi identificada apenas em um dos machos da margem e esquerda e em pequena quantidade (TIC = 1,97%).

Tabela 4. Compostos lipofílicos identificados em três amostras de secreções de machos de *Iphisa elegans*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada indivíduo. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. Margem esquerda - ♂1: MTR36228 e ♂2: MTR36243 e margem direita - ♂3: MTR36599.

TR	Compostos	TIC (%)		
		♂1	♂2	♂3
9.7	2,4-Nonadienal	0,16	-	-
11.1	3-Octen-2-ona	0,07	0,02	0,05
11.7	2-Nonenal	1,48	1,67	0,52
13.1	Nonanal	0,19	0,1	0,12
15.9	4-Decenal	0,07	0,01	0,03
16.1	Decanal	0,04	0,04	0,03
17.7	Aldeído não identificado	0,76	0,24	0,42
19.2	2,4-Decadienal	0,05	-	0,07
24.2	Tridecanal	-	-	0,13
26.6	Tetradecanal	-	-	0,07
28.4	Pentadecanol	-	-	0,25
31.0	Hexadecanal	-	-	0,1
32.2	14-metil-8-Hexadecenal	-	-	0,19
33.1	Heptadecanal	-	-	0,1
35.0	Octadecanal	0,21	0,1	-
38.7	Eicosanal	0,21	0,44	-
39.8	Heneicosanol	1,88	1,12	-

42.0	Tetracosanal	0,42	1,21	0,3
43.0	Hexacosanal	4,39	4,11	5,28
45.1	Hexacosanal	0,04	0,11	0,65
46.1	Heptacosanal	-	-	5,45
47.3	13-Docosenamida	1,97	-	16,25
48.0	Esqualeno	1,17	-	1,03
48.1	Aldeído não identificado	0,32	1,14	0,27
48.2	Esteróide não identificado (147, 161, 215, 316, 370)	-	0,43	0,29
48.4	Esteróide não identificado (215, 257, 355, 379)	-	0,01	0,14
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	-	-	0,2
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	7,21	8,45	3,47
49.0	Cholesta-3,5-diene	1,46	3,78	1,17
51.1	Cholest-6-one	-	0,55	0,73
51.9	Colesterol	26	16,12	17,77
52.0	Colestanol	3,83	9,48	5,1
52.5	Cholestan-3-one	-	-	2,13
52.7	Ergostanol	1,45	4,54	3,3
53.0	Cholesta-3,5-dien-7-one	4,21	5,98	3,39
53.2	Campesterol	4,95	0,74	3,66
53.4	Derivado do Ergostanol	0,39	-	1,07
53.5	Cholest-4-en-3-one	6,12	10,99	5,07
53.7	Stigmasterol	2,17	-	1,86
53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	16,99	17,14	12,99
54.5	γ -Sitosterol	7,02	8,24	3,45
54.6	Derivado do Stigmastanol	-	-	2,9
55.1	4-Campestene-3-one	1,69	1,49	-
55.9	Cholestane-3,6-dione	1,36	-	-
56.6	γ -Sitostenone	1,76	1,75	-

Os três machos apresentaram elevada quantidade de hexacosanal e o ♂3 (margem direita) também apresentou grande quantidade de heptacosanal (5,45%) (**Figura 6**). Álcoois de cadeia longa aparecem como compostos odoríferos frequentes e em maior quantidade em espécies de Lacertidae que ocupam locais de climas mais xéricos (BAECKENS *et al.*, 2017) e diferentes álcoois de alto peso molecular atuam como sinalizadores de dominância e/ou qualidade do macho em outras espécies (KHANOON *et al.*, 2011b). Assim como observado em *Riolama sp. nov.*, *I. elegans* pode direcionar mais dardejadas para o solo, uma vez que também vive em meio ao folhíço, e a presença de grandes quantidades de álcoois de cadeia longa podem aumentar a persistência das marcações feitas no solo reduzindo a velocidade de evaporação dos compostos.

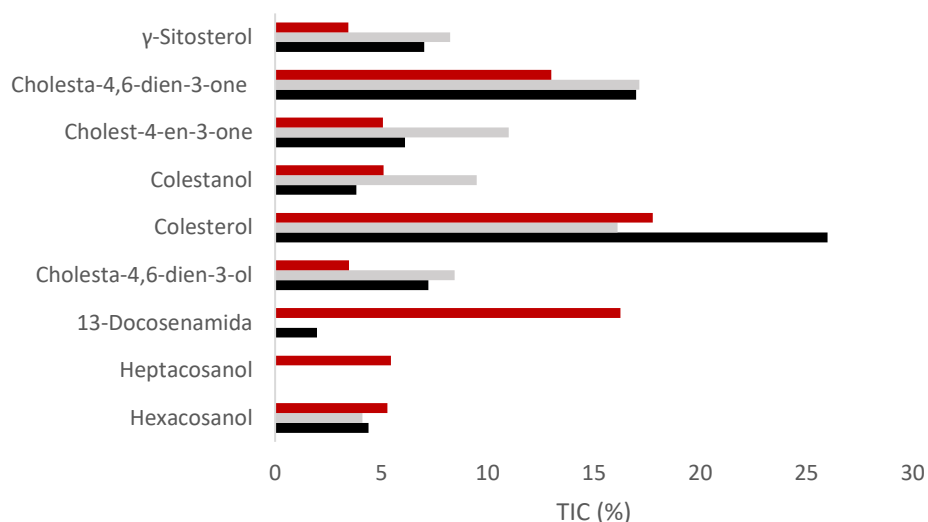


Figura 6. Representação da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos nove compostos lipofílicos mais abundantes em machos adultos de *Iphisa elegans* das duas margens do Rio Içá. Preto: ♂1 MTR36228 (margem esquerda). Cinza: ♂2 MTR36243 (margem esquerda). Vermelho: ♂3 MTR36599 (margem direita).

Os três indivíduos apresentam como esteroides mais abundantes o colesterol e o cholesta-4,6-dien-3-one (**Figura 6**). O ♂1 apresentou o maior CRC e maior quantidade de colesterol, enquanto os ♂2 e ♂3 apresentaram CRC quase idênticos e quantidades muito similares de colesterol. Mais amostras são necessárias para se avaliar se o colesterol sinaliza tamanho, idade e/ou habilidade de luta em *I. elegans* como citado anteriormente para outras espécies. O cholesta-4,6-dien-3-one é resultado da oxidação do colesterol e que em alguns animais parece estar associado com a redução de reservas de gorduras (KANDUTSCH, 1963). Machos da margem esquerda apresentaram aproximadamente o dobro de γ -Sitosterol que, como citado anteriormente, sinaliza idade/tamanho em algumas espécies (WELDON *et al.*, 2008), porém este não parece ser o caso para as três amostras, pois um dos machos da margem esquerda tem CRC similar ao do indivíduo da margem direita e apresentou mais do que o dobro de γ -Sitosterol. Apesar da amostragem reduzida, os dados preliminares sugerem que a composição química da secreção das glândulas femorais pode vir a ser uma ferramenta útil para o estudo das espécies crípticas de *Iphisa*, assim como é para alguns complexos crípticos de Lacertidae (GABIROT *et al.*, 2013).

Leposoma

Leposoma é um gênero de pequenos lagartos que habitam o folhiço de florestas neotropicais (RODRIGUES *et al.*, 2013). Em *Leposoma* apenas machos apresentam poros femorais e *L. puk* é uma espécie difícil de ser encontrada, enquanto *L. scincoides* é bastante comum (RODRIGUES *et al.*, 2002). As duas espécies (**Figura 7**) somaram 33 compostos lipídicos.



Figura 7. Macho adulto de *Leposoma puk* (esquerda) e de *Leposoma scincoides* (direita). Fotos: Mauro Teixeira Jr.

Foram identificados 23 compostos lipofílicos no macho de *L. puk*: quatro aldeídos, três ésteres, seis esteroides, uma amida, o esqualeno, quatro cetonas, três álcoois e o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide (**Tabela 5**). Três compostos de *L. puk* não foram identificados em *L. scincoides*. Os cinco compostos mais abundantes totalizam 78,94% da secreção e o colesterol representou apenas 3,67% da secreção. Em *L. scincoides* foram identificados 30 compostos lipofílicos: sete aldeídos, quatro cetonas, quatro ésteres de ácidos graxos, três álcoois, duas amidas, oito esteroides, o esqualeno e o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide (**Tabela 5**). Dez compostos identificados em *L. scincoides* não foram em *L. puk*.

Em *L. scincoides* é possível separar as cinco amostras de machos dois padrões químicos: o padrão 1 (MTR38974 e MTR38796) apresentou seis aldeídos (1,84%), dois ésteres (1,14%), sete esteroides (84,9%), 13-Docosenamida (9,65%) e esqualeno (2,46%) (**Figura 8**). Os cinco compostos mais abundantes do padrão 1 totalizaram 87,63% da secreção (13-Docosenamida, cholesta-3,5-diene, colesterol, cholest-4-em-3-one e cholesta-4,6-dien-3-one) e o colesterol representou sozinho 24,55% da secreção. O padrão 2 (MTR38630, MTR38656 e MTR38791) apresentou quatro aldeídos (0,54%), quatro ésteres (7,12%), seis esteroides (17,13%), duas amidas (47,82%), esqualeno (13,75%) e oito de outras classes, especialmente álcoois e cetonas (18,98%) (**Figura 8**). Os cinco compostos mais abundantes do padrão 2 somaram

80,67% (13-Docosenamida, hexacosanol, etil éster do ácido hexadecanóico, esqualeno e cholest-3,5-diene) e o colesterol representou apenas 4,1% da secreção

Tabela 5. Compostos lipofílicos identificados em seis amostras de secreções de machos adultos de duas espécies de *Leposoma*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) em cada indivíduo. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. As porcentagens relativas dos machos de *Leposoma scincoides* estão apresentadas como a média dos valores dos indivíduos que fazem parte de um mesmo padrão.

TR	Compostos	<i>L. puk</i>	TIC (%)	
			<i>L. scincoides</i> padrão 1	padrão 2
9.807	2,4-Nonadienal	-	0,04	-
13.198	Nonanal	-	0,65	0,01
16.197	Decanal	0,14	0,17	0,07
26.608	Tetradecanal	0,45	-	0,39
28.879	Pentadecanal	0,39	-	-
31.039	Hexadecanal	0,64	0,025	0,13
31.242	Éster não identificado do Ácido Tetradecanóico	0,64	-	0,42
32.653	3-Heptadecanona	0,17	-	0,07
33.129	Heptadecanal	-	0,09	-
33.245	Metil éster do Ácido Hexadecanóico	0,17	-	0,43
34.609	Etil éster do Ácido Hexadecanóico	7,88	0,035	6,33
35.082	Octadecanal	-	0,5	-
36.515	3-Octadecanona	1,49	-	1,25
39.811	Heneicosanol	1,81	-	1,74
40.042	Cetona não identificada	0,33	-	0,17
40.827	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	1,1	-	1,08
42.811	Hexacosanol	6,81	-	8,46
43.284	Cetona não identificada	0,6	-	0,42
43.494	Éster não identificado do Ácido 9-Octadecenóico	-	1,1	0,23
46.045	Heptacosanol	0,24	-	4,17
47.199	Esteróide não identificado (135, 247, 368, 400)	-	1,38	-
47.349	13-Docosenamida	25,4	9,65	47,82
47.636	Amida não identificada	-	-	0,29
48.041	Esqualeno	25,79	2,46	13,75
48.558	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,57	2,92	0,55
48.716	Cholesta-4,6-dien-3-ol	-	2,6	-
49.000	Cholesta-3,5-diene	3,85	7,52	4,31

49.945	Esteróide não identificado (155, 197, 251, 376, 539)	-	-	0,71
51.908	Colesterol	3,71	24,55	4,1
52.115	Éster do Ácido 9-Hexadecenóico (236, 542)	2,84	-	-
53.030	Cholesta-3,5-dien-7-one	13,06	-	-
53.583	Cholest-4-en-3-one	1,92	28,77	2,68
53.985	Cholesta-4,6-dien-3-one	-	17,14	0,33

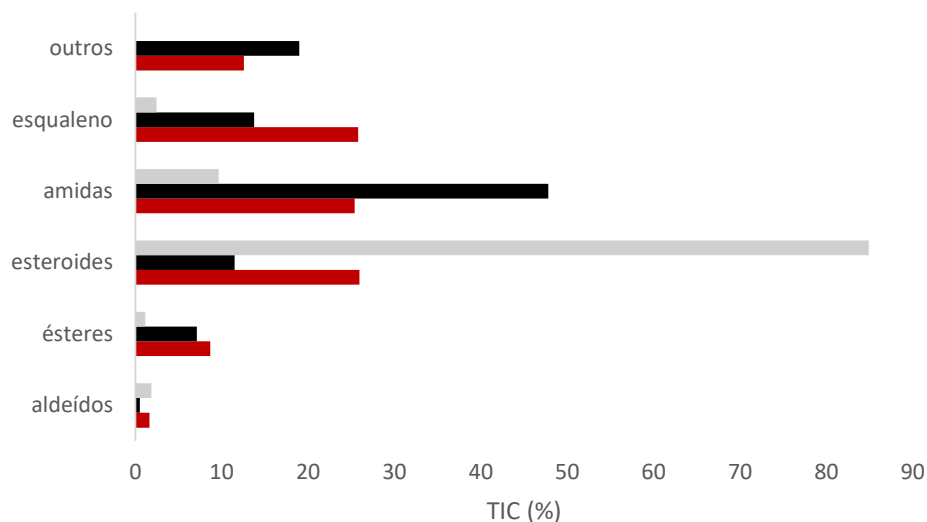


Figura 8. Representação da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada classe de compostos lipídicos identificados nas seis amostras de machos adultos de *Leposoma* do Parque Nacional do Alto Cariri, Bahia. Cinza: padrão 1 de *Leposoma scincoides*. Preto: padrão 2 de *Leposoma scincoides*. Vermelho: *Leposoma puk*.

O macho de *L. puk* apresentou mais similaridades com o padrão 2 dos machos de *L. scincoides*. Para esses machos, todos com CRC igual ou maior a 3,67 cm, há significativas quantidades de 13-Docosenamida, hexacosanol, esqualeno e o éster etílico do ácido hexadecanóico e baixa quantidade de colesterol. Já o padrão 2 de *L. scincoides* apresentou grandes quantidades de colesterol, cholest-4-en-3-one e cholesta-4,6-die-3-one. Em outros Squamata o esqualeno é encontrado em maior quantidade nos machos, podendo sinalizar o sexo e estar relacionado com aumento da agressividade entre machos (MASON *et al.*, 1989; LÓPEZ & MARTÍN, 2009). Grandes quantidades de esqualeno só foram observadas nos machos de maior tamanho corporal que apresentaram também quantidades significativas de compostos odoríferos, indicando que esses machos podem estar em momentos distintos de seus respectivos ciclos reprodutivos e/ou que possuíam *status* diferentes na população. Outro aspecto interessante dessas amostras foi a presença de quantidades elevadas de 13-Docosenamida, uma amida que parece desempenhar importantes funções no metabolismo de vertebrados (TAMILMANI *et al.*, 2018), mas a literatura não aponta

sua potencial função nas interações químicas entre lagartos. Mais amostras de *L. puk* são necessárias para que se possa confirmar que os compostos exclusivos de *L. scincoides* realmente não fazem parte da secreção de *L. puk* e podem, potencialmente, ter função no reconhecimento específico dessas duas espécies que ocorrem em simpatria.

Loxopholis snethlageae

Loxopholis snethlageae é um lagarto pequeno, que habita o folhiço em florestas da Amazônia e apresenta hábito diurno (ÁVILA-PIRES, 1995) (**Figura 9**). A espécie foi descrita dentro do grupo *Leposoma parietale* (ÁVILA-PIRES, 1995), mas recentemente dados moleculares separaram as espécies do grupo no gênero *Loxopholis* (GOICOECHEA *et al.*, 2016). Em *L. snethlageae* foram identificados apenas 16 compostos lipofílicos (**Tabela 6**): um álcool, dois ésteres, um aldeído, uma amida, o esqualeno e 10 esteroides. O número de compostos identificados em *L. snethlageae* foi inferior ao identificado para todas as outras espécies analisadas neste trabalho. Por apresentar um padrão tão atípico, foram verificadas as etapas pelas quais as amostras passaram buscando por eventuais explicações. Há duas possíveis explicações para este padrão na espécie: (1) o baixo número de compostos lipídicos pode ser um evento biológico real, representando baixa diversidade de compostos em *L. snethlageae* durante o período e (2) a baixa quantidade de material nas amostras (menos de 0,5 mg por indivíduo) permitiu apenas a detecção dos compostos mais abundantes na secreção.



Figura 9. Macho adulto de *Loxopholis snethlageae*. Foto: Mauro Teixeira Jr.

Mesmo com o baixo número de compostos é possível observar que o colesterol foi o principal esteroide (TIC entre 27,9% e 55,92%) e em alguns indivíduos foram encontradas porcentagens significativas de colestanol, campesterol e ergosta-5,7-dien-

3-one. Três indivíduos apresentaram grandes quantidades de 13-Docosenamida (TIC > 19,55%), quatro indivíduos apresentaram quantidades significativas, mas com grande variação interindividual, de hexanol (TIC entre 3,55% e 18,35%) e em todos os indivíduos foi detectada a presença de esqualeno (TIC entre 3,08% e 8,55%).

Tabela 6. Compostos lipofílicos identificados em cinco amostras de secreções de machos adultos de duas espécies de *Loxopholis snethlageae*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) em cada indivíduo. Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5
4.2	Hexanol	7,14	3,55	18,35	-	4,12
33.2	Metil Éster do Ácido Hexadecanóico	2,39	-	-	-	-
35.0	Octadecanal	2,43	1,28	-	1,27	1,8
39.4	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	4,85	3,06	-	2,71	4,88
47.1	Cholest-5-en-3-ol	-	-	-	-	3,07
47.3	13-Docosenamida	5,37	38,62	34,73	4,94	19,55
48.0	Esqualeno	6,72	3,08	8,55	4,62	6,53
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	-	-	10,47	-	-
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	-	-	-	1,46	2,4
49.0	Cholesta-3,5-diene	1,35	0,91	-	2,97	7,08
51.9	Colesterol	42,43	32,94	27,9	55,92	30,58
54.1	Colestanol	12,45	7,08	-	3,75	-
54.6	Ergosta-5,7-dien-3-ol	9,74	6,93	-	13,76	6,04
55.7	Campesterol	5,13	2,55	-	7,14	9,24
56.5	Cholest-4-en-3-one	-	-	-	1,46	-
57.0	Lanost-8-en-3-ol	-	-	-	-	4,71

Comparação interespecífica dos compostos lipofílicos

Considerando a filogenia molecular mais recente (GOICOCHEA *et al.*, 2016) é a seguinte a relação de parentesco entre as espécies estudadas ((*Riolama* + *Iphisa*) (*Neusticurus* (*Leposoma* + *Loxopholis*))). Nas seis espécies de Gymnophthalmidae foram identificados 102 compostos lipofílicos. Apenas cinco compostos foram identificados em todas as espécies: o derivado do cholesta-2,4-diene, o cholesta-3,5-diene, o colesterol, o cholest-4-en-3-one e o esqualeno. Excluindo as amostras de *L. snethlageae*, que apresentaram número muito baixo de compostos, além dos cinco compostos citados anteriormente, o hexadecanal também é compartilhado pelas cinco

espécies restantes. As duas espécies de *Leposoma* somaram 33 compostos lipídicos e 20 são compartilhados entre as duas, representando aproximadamente 60% do total de compostos identificados no gênero. Dos 16 compostos identificados em *Loxopholis*, 10 foram identificados em pelo menos uma das espécies de *Leposoma*. Dos 43 compostos presentes em *N. medemi*, 15 foram também identificados no agrupamento (*Leposoma* + *Loxopholis*), 18 em *I. elegans* e 19 em *Riolama sp. nov.* *I. elegans* e *Riolama sp. nov.* compartilharam 10 compostos lipídicos.

É bastante difícil identificar o exato *status* reprodutivo de machos de espécies pequenas de Gymnophthalmidae sem a realização de cortes histológicos dos testículos (NISA *et al.*, 2017). Todos os machos analisados neste capítulo apresentaram CRC de indivíduos adultos e testículos e ductos deferentes opacos e enovelados, mas é impossível dizer se todos estavam no mesmo estágio do seu ciclo reprodutivo. Levando em consideração que a composição química das secreções pode ser afetada pelo momento do ciclo reprodutivo de cada indivíduo (ver CAPÍTULOS anteriores), as comparações realizadas para presença/ausência de compostos buscando por similaridades e diferença entre as espécies apresentam limitações significativas. Mesmo com tais limitações, alguns aspectos interessantes podem ser evidenciados para a composição química das seis espécies de Gymnophthalmidae:

1. Todos os indivíduos apresentaram colesterol, embora as porcentagens tenham apresentado variação significativa. Com exceção de *L. puk*, o colesterol foi um dos principais esteroides nas secreções.
2. Apenas *Riolama sp. nov.* apresentou o cholesta-5,7-dien-3-ol e dois ésteres de elevado peso molecular em grandes quantidades.
3. Em *I. elegans* foi encontrado maiores porcentagens de cholesta-4,6-dien-3-ol e cholesta-4,6-dien-3-one, além de maior diversidade de aldeídos e maior porcentagem de álcoois de elevado peso molecular.
4. *N. medemi* e *Riolama sp. nov.* foram as únicas espécies que apresentaram α -Tocoferol.
5. O único ácido graxo encontrado em Gymnophthalmidae foi o hexadecanóico e em quantidades muito baixas. As seis espécies apresentaram como compostos odoríferos aldeídos, mas principalmente, ésteres de ácidos graxos e álcoois de elevado peso molecular.

Padrão proteico

Não foi possível realizar eletroforese em gel para *L. puk*, *L. scincoides* e *L. snethlageae*, pois a quantidade de material em cada uma delas era bastante baixa inviabilizando uma boa extração das proteínas após a realização da CG-MS. Para *N. medemi*, *I. elegans* e *Riolama sp. nov.* foi possível determinar o padrão proteico dos mesmos indivíduos que haviam sido estudados previamente por CG-MS (**Figura 10**).

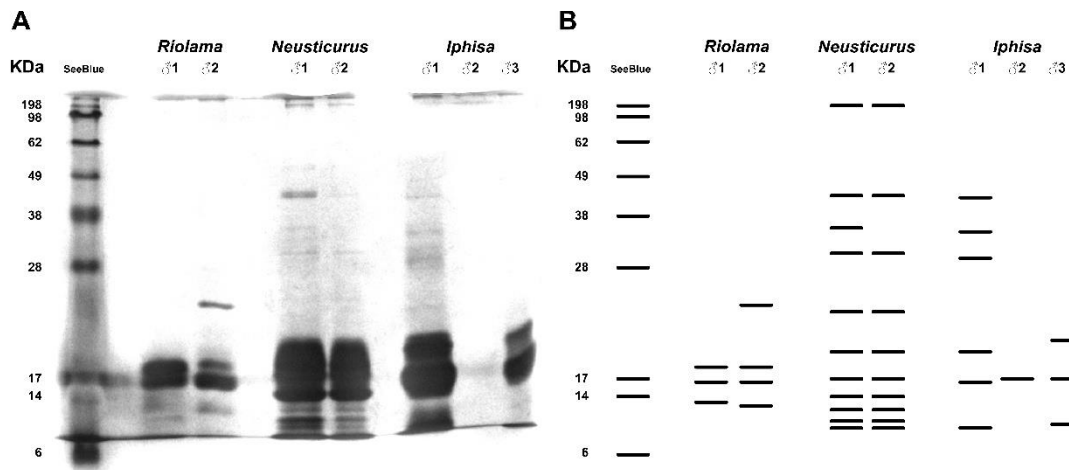


Figura 10. Padrão de bandas proteicas de indivíduos machos adultos de *Riolama sp. nov.*, *Neusticurus medemi* e *Iphisa elegans* e marcador de peso molecular SeeBlue2. (A) Imagem original da eletroforese em gel SDS-PAGE em coloração com nitrato de prata e (B) mapa indicando as bandas que podem ser observadas no gel.

Riolama sp. nov. apresentou quatro bandas proteicas, três presentes nos dois machos e uma presente apenas no macho de maior CRC (aproximadamente 23 KDa). Em *I. elegans* foram identificadas sete bandas proteicas. O ♂2 apresentou uma única banda (aproximadamente 17 KDa) e esse padrão não pode ser explicado pelo CRC, uma vez que o ♂3 apresentou três bandas proteicas e tem CRC igual ao do ♂2. O ♂1 de *I. elegans* apresentou sete bandas que se dividiram em dois grupos, um com bandas com mais de 30 KDa e outro com menos de 20 KDa. Em *N. medemi* foram identificadas 10 bandas proteicas, uma foi identificada apenas em um indivíduo (aproximadamente 38 KDa) e foi possível observar que as bandas de *N. medemi* se separaram em três blocos: uma com mais de 100 KDa, três bandas entre 30 e 48 KDa e sete bandas com menos de 24 KDa. Nas três espécies, as bandas proteicas mais intensas apresentaram entre 12 KDa e 18 KDa, correspondendo às principais proteínas presentes nas secreções dessas espécies.

Embora haja sobreposição na composição de proteínas entre as três espécies, cada uma delas apresentou um padrão único e distinguível das outras, permitindo sua identificação. Com base na matriz de similaridades calculadas entre os padrões de bandas proteicas das oito amostras, foi possível construir uma árvore com base no método UPGMA que recuperou as relações filogenéticas conhecidas para as três espécies, com *Riolama* em posição externa ao agrupamento formado por *N. medemi* e *Iphisa*. As amostras de *I. elegans* se dividiram em dois agrupamentos, o ♂1 (maior número de bandas proteicas) aparece próximo aos dois machos de *N. medemi* enquanto os outros dois machos de *I. elegans* (baixo número de bandas proteicas) formam um segundo agrupamento.

Teiidae

Cnemidophorus lemniscatus

Cnemidophorus lemniscatus é uma espécie da subfamília Teiinae que ocupa áreas abertas dentro da Amazônia, de tamanho corporal médio (ÁVILA-PIRES, 1995) e que apresenta entre 41 e 57 poros femorais totais (HARVEY *et al.*, 2012) (**Figura 11**). Os dois machos amostrados apresentaram testículos opacos e ductos deferentes opacos e enovelados. Trinta e três compostos lipofílicos foram identificados nas duas amostras de machos adultos (**Tabela 7**): cinco aldeídos, cinco ácidos graxos, seis ésteres de ácidos graxos, 11 esteroides, duas formas do tocoferol, uma cetona, uma amida, um álcool e esqualeno. No indivíduo de CRC igual a 6 cm (♂1) foram identificados 18 compostos: cinco ésteres, oito esteroides, duas formas do tocoferol, um aldeído, um ácido graxo e o esqualeno. No indivíduo de 7 cm (♂2) foram identificados 31 compostos: cinco aldeídos, cinco ácidos graxos, quatro ésteres, 11 esteroides, duas formas do tocoferol, uma amida, uma cetona, um álcool e o esqualeno.

O ♂1 apresentou dois compostos exclusivos: éster metílico do ácido hexadecanóico (TIC = 0,2%) e o éster não identificado (TR = 38.1 minutos) (TIC = 0,33%). No ♂2 foram identificados 15 compostos que não foram observados no ♂1: quatro aldeídos (TIC = 0,95%), quatro ácidos graxos (TIC = 0,48%), três esteroides (3,61%), um éster não identificado (TR = 39.2 minutos) (0,12%), a 9-Octadecanamida (TIC = 0,01%), a 6,10,14-Trimetil-2-Pentadecanona (TIC = 0,06%) e o heptadecanol

(TIC = 0,21%). Dos 16 compostos compartilhados pelos dois indivíduos há quantidades similares de ácido hexadecanóico (TIC: 2,79% e 2,93%), colesterol (TIC: 25,09% e 30,39%), α -Tocoferol (TIC: 17,97% e 18,53%), campesterol (TIC: 4,98% e 4,99%) e lanosterol (TIC: 15,43% e 14,13%). Nos dois machos as secreções foram formadas, em sua maior parte, por α -Tocoferol (TIC: ♂1 = 17,97% e ♂2 = 18,53%) e esteroides (TIC: ♂1 = 74,41% e ♂2 = 64,67%).



Figura 11. Macho adulto de *Cnemidophorus lemniscatus*. Foto: Mauro Teixeira Jr.

Tabela 7. Compostos lipofílicos identificados em duas amostras de secreções femorais e pré-anais de machos adultos de *Cnemidophorus lemniscatus*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC. ♂1: MTR 41519 e ♂2: MTR 41508.

TR	Compostos	TIC (%)	
		♂1	♂2
18.7	2,4-Decadienal	0	0,43
19.4	2,4-Dodecadienal	0	0,23
23.3	Ácido Dodecanóico	0	0,06
29.5	Pentadecanal	0	0,24
30.6	Ácido Tetradecanóico	0	0,26
31.8	Hexadecanal	0,11	0,73
32.3	6,10,14-Trimetil-2-Pentadecanona	0	0,06
33.2	Hexadecanol	0	0,21
34.1	Metil éster do Ácido Hexadecanóico	0,2	0
34.9	Ácido Hexadecanóico	2,79	2,93
35.5	Etil éster do Ácido Hexadecanóico	0,22	0,68
36.1	Octadecanal	0	0,05
38.1	Éster não identificado	0,33	0
38.7	Ácido 9,12-Octadecadienóico	0	0,08

38.8	Ácido Octadecanóico	0	0,08
38.9	Etil éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,45	0,35
39.1	Amida não identificada	0	0,01
39.2	Éster de 18C não identificado	0	0,12
39.4	Etil éster do Ácido Octadecanóico	0,16	0,35
49.5	Esqualeno	4,69	7,52
50.4	Cholesta-4,6-dien-3-ol	0,54	0,22
50.7	Cholesta-3,5-diene	0,46	0,12
52.5	Esteróide não identificado (155, 197, 251, 363, 378)	0	0,4
52.8	γ -Tocoferol	1,39	2,41
53.8	Colesterol	25,09	30,39
53.9	α -Tocoferol	17,97	18,53
54.5	Ergosta-7,22-dien-3-ol	0	2,57
55.1	Ergosterol	9,79	4,79
55.4	Esteróide não identificado (105, 161, 213, 314, 400)	0	0,64
55.5	Campesterol	4,98	4,99
56.2	Ergosta-5,8-dien-3-ol	0,6	1,7
56.7	Lanost-8-en-3-ol	14,8	4,72
57.6	Lanosterol	15,43	14,13

Quando comparadas as secreções dos dois machos por classes de compostos (**Figura 12**), o ♂2 apresentou maior diversidade e porcentagem de compostos odoríferos e menor quantidade de esteroides. Aldeídos são encontrados em maior proporções em espécies de Lacertidae que habitam locais de clima méxico e aumentam a volatilidade da secreção, assim como ácidos graxos (BAECKENS *et al.*, 2017). Ao contrário do que foi observado anteriormente para alguns Gymnophthalmidae, *C. lemniscatus* não vive sob o folhíço e a transmissão de informações via ar pode ser favorecida, tornando vantajoso o aumento da volatilidade das secreções durante a estação reprodutiva que poderão alcançar maiores distâncias nas áreas abertas. A maior porcentagem dessas classes de compostos no macho de maior tamanho corporal pode indicar características próprias do indivíduo, porém esta hipótese só poderá ser testada com o aumento do número de amostras e avaliação do *status* reprodutivo de cada indivíduo.

Embora os dois machos de *C. lemniscatus* tenham apresentado quantidades idênticas de campesterol e lanosterol, apresentaram variação na quantidade de ergosterol, lanost-8-en-3-ol e de ergosta-5,8-dien-3-ol. O lanost-8-en-3-ol faz parte da secreção de outras espécies de lagartos, porém aparece em pequenas quantidades e sua

função nas interações químicas de Squamata ainda não foi estudada (ARAGÓN *et al.*, 2008; WELDON *et al.*, 2008; MARTÍN *et al.*, 2016b). Em outras espécies de Teiidae analisadas neste trabalho também foram encontradas quantidades significativas de lanost-8-en-3-ol, mas este esteroide não foi identificado no trabalho de MARTÍN e colaboradores (2011) para *Salvator merianae*. A quantidade de lanosterol nos dois indivíduos é bastante significativa, é um composto que pode ser transformado em colesterol (MARTÍN *et al.*, 2016b) e é o principal esteroide na secreção de *Iguana iguana*, tanto durante a estação reprodutiva quanto fora dela (ALBERTS *et al.*, 1992a), e ocorre em pequenas quantidades em várias outras espécies, porém até onde temos conhecimento, sua exata função na secreção de lagartos ainda não foi testada.

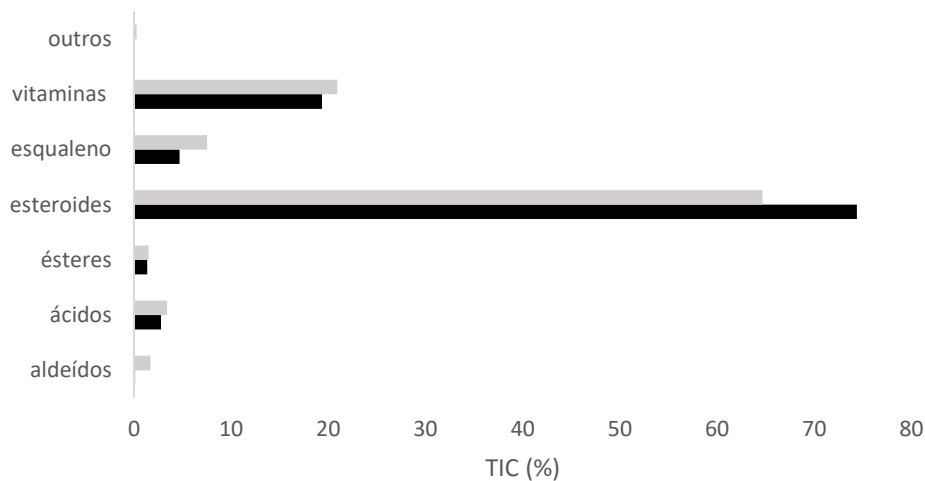


Figura 12. Representação da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) de cada classe de compostos lipídicos identificados nas duas amostras de machos adultos de *Cnemidophorus lemniscatus* da região do Rio Içá. Preto: macho de CRC igual a 6 cm. Cinza: macho de CRC igual a 7 cm.

O campesterol (origem vegetal) e o ergosterol (origem microbial) são esteroides que precisam ser adquiridos da dieta e suas quantidades nas secreções podem estar diretamente relacionadas com a qualidade da dieta do macho em duas espécies de Lacertidae (MARTÍN & LÓPEZ, 2006b e c). A quantidade de campesterol na secreção de *Podarcis muralis* (Lacertidae) também sofre interferência da qualidade da termorregulação (HEATHCOTE *et al.*, 2014). As quantidades de campesterol e ergosta-5,8-dien-3-ol também podem aumentar em *Iberolacerta cyreni* (Lacertidae) se o indivíduo passar por repetidas situações de estresse como, por exemplo, tentativas de fuga sequenciais (ARAGÓN *et al.*, 2008). Pelas significativas quantidades desses esteroides nos machos de *C. lemniscatus* seria interessante, não apenas caracterizar a composição química da secreção de um maior número de indivíduos, como também

realizar experimentos comportamentais para compreender a função desses esteroides nas interações sociais da espécie.

Crocodylurus amazonicus

Crocodylurus amazonicus é uma espécie da subfamília Tupinambinae que ocorre na Amazônia em locais com muita água, apresenta hábito semiaquático e informações sobre sua ecologia são escassas (MARTINS, 2006). Assim como as outras espécies da subfamília Tupinambinae, *C. amazonicus* é um lagarto de grande porte (CRC máximo = 22,2 cm) e fêmeas e machos apresentam entre quatro e dez poros pré-anais e entre 12 e 24 poros femorais (HARVEY *et al.*, 2012) (**Figura 13**).



Figura 13. *Crocodylurus amazonicus*. Foto: Jake Scott (Disponível na plataforma online Flickr).

Foram identificados 16 compostos lipofílicos para a espécie: um álcool, esqualeno, γ -Tocoferol e 13 esteroides (**Tabela 8**). Na fêmea adulta (CRC = 20 cm) foram identificados nove compostos: oito esteroides (TIC = 72,01%) e o esqualeno (TIC = 27,99%). No macho jovem (CRC = 11,9 cm) foram identificados os 16 compostos, sendo exclusivos para esse indivíduo o γ -Tocoferol (TIC = 0,46%), o álcool não identificado de alto peso molecular (TR = 65.6 min) (TIC = 2,11%) e cinco esteroides (TIC = 6,57%). Um número tão baixo de compostos não é comum, provavelmente esse padrão é reflexo de baixa quantidade de material que impossibilitou uma boa extração dos compostos lipofílicos. Um aspecto interessante dessas amostras é a ausência de compostos odoríferos (ácidos graxos, ésteres, aldeídos e álcoois), apenas o macho juvenil apresentou um álcool representando aproximadamente 2% de sua secreção.

Tabela 7. Compostos lipofílicos identificados em duas amostras de secreções femorais e pré-anais de *Crocodilurus amazonicus*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	TIC (%)	
		♂	♀
49.2	Derivado do Cholest-2-ene	0,83	0
49.5	Esqualeno	2,01	27,99
49.8	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,74	0
50.4	Cholesta-4,6-dien-3-ol	2,2	1,67
50.7	Cholesta-3,5-diene	1,54	1,11
51.3	γ -Tocoferol	0,46	0
52.9	3-methoxy-Cholest-5-ene	6,12	1,45
53.3	Derivado do Cholestan-3-ol	14,31	7,23
53.8	Colesterol	59,42	50,24
54.5	Ergosta-7,22-dien-3-ol	2,39	0
55.0	Colestanol	2,66	1,16
55.8	Cholest-4-en-3-one	1,74	0
56.3	Cholesta-4,6-dien-3-one	0,87	0
56.9	Lanosta-8,24-dien-3-one	0,68	1,34
57.5	Lanosterol	1,92	7,81
65.6	Álcool não identificado	2,11	0

Quando comparamos as porcentagens dos quatro compostos mais abundantes em cada uma das amostras notamos algumas diferenças expressivas (**Figura 14**). O esqualeno representa 27,99% da secreção da fêmea adulta, mas apenas 2,01% da secreção do macho jovem. O esqualeno é ainda um precursor bioquímico de diversos esteroides e hormônios como, por exemplo, a testosterona (LÓPEZ & MARTÍN, 2009) o que torna curiosa sua porcentagem na amostra da fêmea adulta de *C. amazonicus*. Mais amostras seriam necessárias para determinar se esta é uma anomalia individual ou se é o padrão da espécie e quais seriam as possíveis explicações. O cholestan-3-ol é outro esteroide abundante em *C. amazonicus*, representando 14,31% da secreção do macho jovem e 7,23% da secreção da fêmea adulta. Este esteroide já foi identificado em outras espécies de lagartos (WELDON *et al.*, 1990; KHANNOON *et al.*, 2011b; LOUW *et al.*, 2011; MARTÍN *et al.*, 2016a), mas com exceção de duas espécies de *Liolaemus* (Liolaemidae) (ESCOBAR *et al.*, 2001), sua porcentagem é baixa (< 3%) e não há na literatura informações sobre sua função em secreções femorais de lagartos.

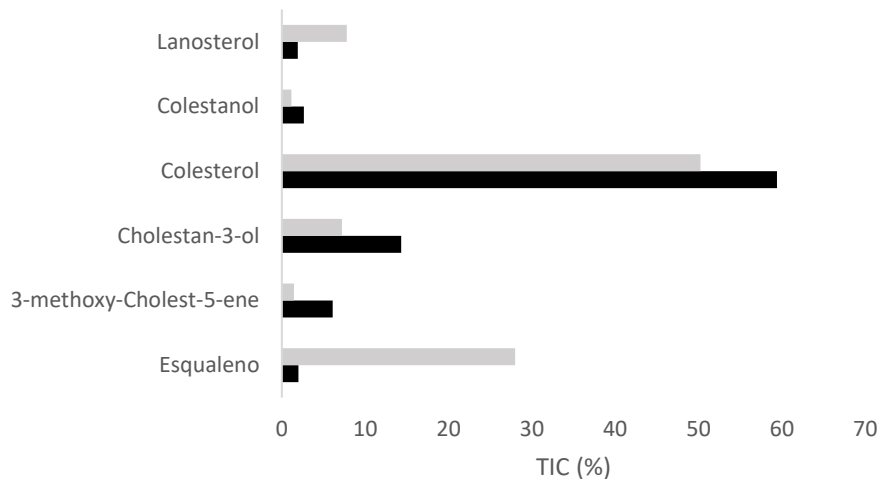


Figura 14. Representação da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos principais compostos lipofílicos das amostras de *Crocodilurus amazonicus* da região do Rio Negro, Amazonas. Preto: macho jovem. Cinza: fêmea adulta.

A porcentagem de cada composto é sempre apresentada como a porcentagem relativa de um determinado pico em relação a corrente total de íons (TIC). Mesmo com o macho apresentado quase o dobro de compostos do que a fêmea, o colesterol foi o composto mais abundante nas duas amostras e representa aproximadamente metade da secreção (TIC = 59,42% e 50,24%), indicando que essa é uma representação real da importância do colesterol na secreção da espécie. Este é mais um registro de colesterol em uma espécie de Teiidae contrapondo o perfil químico encontrado para *Salvator merianae* por MARTÍN e colaboradores (2011).

Tupinambis teguixin

Tupinambis teguixin até recentemente representava um complexo críptico que agora conta com quatro espécies (MURPHY *et al.*, 2016). *Tupinambis teguixin* (**Figura 15**) ocorre em simpatria com *T. cryptus* e é reconhecida por dados moleculares e morfológicos. Dados da década de 1990 mostram que machos e fêmeas adultos de *T. teguixin* são capazes de discriminar itens alimentares apenas com base em pistas químicas (YANOSKY *et al.*, 1993). Em *T. teguixin* são observados entre 9 e 13 poros femorais em cada membro posterior de fêmeas e machos (MURPHY *et al.*, 2016).



Figura 15. Macho adulto de *Tupinambis teguixin* da Amazônia brasileira. Foto: Mauro Teixeira Jr.

Foram identificados 36 compostos lipofílicos em *Tupinambis teguixin* (**Tabela 8**): quatro aldeídos, dois ácidos graxos, cinco ésteres, 19 esteroides, três formas do tocoferol, um álcool, uma cetona e o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide. No macho adulto (CRC = 21,9 cm) foram identificados 16 compostos: dois aldeídos, dois ácidos graxos, oito esteroides, o hexadecanol, a 6,10,14-Trimetil-2-Pentadecanona, γ -Tocoferol e o 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide. No macho juvenil (CRC = 11,9 cm) também foram identificados 16 compostos, sendo 12 esteroides, duas formas do tocoferol e dois aldeídos e a fêmea adulta (CRC = 23,2 cm) foi a que apresentou maior número de compostos, 30 no total, incluindo três aldeídos, cinco ésteres, 18 esteroides, três formas do tocoferol e a 6,10,14-Trimetil-2-Pentadecanona. A secreção de *T. teguixin* foi constituída principalmente de esteroides (TIC: fêmea = 77,41%, macho jovem = 97,02% e macho adulto = 97,48%) com baixa quantidade de compostos odoríferos.

Tabela 8. Compostos lipofílicos identificados em três amostras de secreções femorais de *Tupinambis teguixin*. Para cada composto está indicado o tempo de retenção (TR) em minutos e a sua porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC). Compostos que não possuem nome em português são apresentados seguindo as normas da IUPAC.

TR	Compostos	TIC (%)		
		♀	Juvenil	♂
13.2	Nonanal	0,02	0,02	0
15.7	4-Decenal	0,03	0,18	0,28
30.7	Hexadecanol	0	0	0,16
31.2	Hexadecanal	0	0	0,16
31.6	6,10,14-Trimetil-2-Pentadecanona	0,02	0	0,2
34.2	Ácido Hexadecanóico	0	0	0,77
34.5	Etil Éster do Ácido Hexadecanóico	0,65	0	0
35.0	Octadecanal	0,06	0	0

36.4	Etil Éster do Ácido Heptadecanóico	0,04	0	0
37.6	Etil Éster do Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,69	0	0
37.7	Etil Éster do Ácido 9-Octadecenóico	0,16	0	0
38.1	Ácido Octadecanóico	0	0	0,34
38.1	Etil Éster do Ácido Octadecanóico	0,38	0	0
41.6	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	0	0	0,34
47.1	Derivado do Colesterol	0,29	0,33	0
49.3	Cholesta-2,4-diene	0	0	3,59
47.9	Derivado do Cholest-2-ene	0,08	0	0
48.1	Derivado do Cholest-4-ene	0,5	0	0
48.2	Cholest-2-ene	9,38	15,11	12,29
48.4	Cholest-4-ene	3,65	5,59	4,59
48.5	Derivado do Cholesta-2,4-diene	0,65	1,12	0
48.7	Cholesta-4,6-dien-3-ol	0,95	1,22	2,49
48.9	Cholesta-3,5-diene	3,19	4,12	6,24
49.9	γ -Tocoferol	0,4	0,12	0,27
51.0	Tocoferol não identificado	0,68	0	0
51.2	3-methoxy-Cholest-5-ene	19,4	23,69	16,41
51.3	3-methoxy-Cholestane	0,38	0	0
51.6	Derivado do Cholesta-3,5-diene	0,23	0	0
51.9	Colesterol	18,75	9,53	48,64
52.0	Colestanol	3,39	2,03	0
52.0	α -Tocoferol	19,17	2,66	0
52.5	Cholestan-3-one	6,37	15,64	3,23
53.3	Campesterol	1,15	0	0
53.5	Cholest-4-en-3-one	5,46	12,59	0
53.7	Stigmasta-3,5-diene	0,8	0	0
53.9	Cholesta-4,6-dien-3-one	3,08	6,05	0

As amostras foram obtidas em diferentes localidades, o que nos possibilita presumir que as significativas quantidades de cholest-2-ene (TIC: $12,26 \pm 2,87\%$) e de 3-methoxy-cholest-5-ene (TIC: $19,83 \pm 3,66\%$) (**Figura 16**) são características da espécie, uma vez que não podem ser explicadas por diferenças de localidade, sexo, idade ou estado reprodutivo. Ambos compostos já foram observados em outra espécie de lagarto, mas não em porcentagens tão elevadas (MARTÍN *et al.*, 2016a), não foram encontrados em *Salvator merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011) e ainda não há informações sobre suas respectivas funções nas secreções. O α -Tocoferol é um antioxidante, pode indicar a qualidade do macho em algumas espécies de lagartos e sua porcentagem pode apresentar significativa variação (individual, populacional, filogenética) (WELDON *et al.*, 2008; MARTÍN & LÓPEZ, 2010a). Entre os três indivíduos de *T. teguixin* a vitamina

E não foi identificada no macho, mas representa 19,17% da secreção da fêmea e 2,66% do juvenil (**Figura 16**), a causa desta diferença precisa ser confirmada e investigada no futuro com maior amostragem de diferentes localidades e em diferentes momentos do ciclo reprodutivo.

O macho adulto foi quem apresentou a maior quantidade de colesterol (**Figura 16**) e apresentou o mesmo número de compostos que o macho juvenil, então a grande porcentagem relativa de colesterol não é justificada pelo baixo número de compostos na amostra. Os três indivíduos apresentaram colesterol em quantidades variáveis (TIC: $25,64 \pm 20,45\%$) e não há informações o suficiente para explicar tais diferenças, mas é mais uma espécie de Teiidae com colesterol em sua secreção. No macho jovem o cholestan-3-one e o cholest-4-en-3-one foram observados em grandes porcentagens (**Figura 16**). O cholestan-3-one foi identificado em outras espécies de lagartos e faz parte do metabolismo do colesterol (WELDON *et al.*, 2008) e em *Tupinambis teguixin* observamos uma correlação negativa entre a quantidade dos dois compostos. O cholest-4-en-3-one está associado com a redução do acúmulo de corpos adiposos em ratos (SUZUKI *et al.*, 1998) e uma hipótese a ser testada em *T. teguixin* é se este esteroide apresenta função similar, podendo aparecer em maiores quantidades em indivíduos em fase de crescimento que precisam de maior quantidade de energia para o aumento de velocidade do metabolismo.

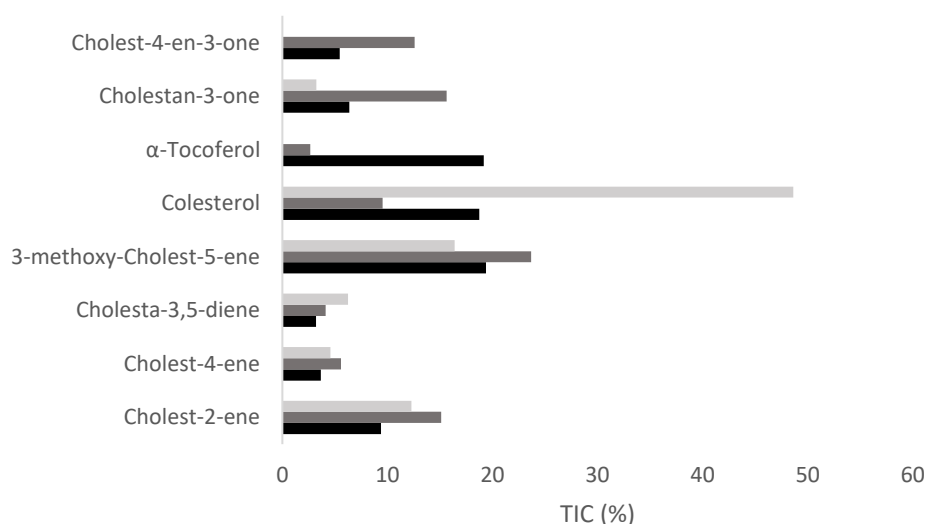


Figura 16. Representação da porcentagem relativa à corrente total de íons (TIC) dos principais compostos lipofílicos das amostras de *Tupinambis teguixin* da região da Amazônia brasileira. Preto: fêmea adulta. Cinza escuro: macho jovem. Cinza claro: macho adulto.

Comparação interespecífica dos compostos lipofílicos

As três espécies de Teiidae analisadas neste capítulo somaram 58 compostos lipofílicos. Como em *C. amazonicus* só foram encontrados esteroides, esqualeno e tocoferol, as comparações foram realizadas isolando apenas os 29 esteroides identificados nas três espécies. Apenas três esteroides foram identificados em todas as espécies: cholesta-4,6-dien-3-ol, cholesta-3,5-diene e colesterol. *Crocodylus amazonicus* compartilhou 10 esteroides com *T. teguixin*, correspondendo a 77% da diversidade de esteroides de *C. amazonicus* e 53% dos esteroides de *T. teguixin*. Entre *C. amazonicus* e *C. lemniscatus* foram quatro esteroides compartilhados, 31% dos esteroides de *C. amazonicus* e 33% dos esteroides de *C. lemniscatus*. Apenas três esteroides foram compartilhados por *T. teguixin* e *C. lemniscatus*, os mesmos que foram compartilhados por todas as espécies, e representaram 16% dos esteroides de *T. teguixin* e 25% dos de *C. lemniscatus*.

Tupinambis teguixin e *C. amazonicus* fazem parte da subfamília Tupinambinae e *C. lemniscatus* da subfamília Teiinae (HARVEY *et al.*, 2012; GOICOECHEA *et al.*, 2016). Quando comparada a porcentagem total de compostos de *T. teguixin* compartilhada com as outras duas espécies, vemos que não há diferenças significativas (28% compartilhados com *C. amazonicus* e 33% com *C. lemniscatus*), mas o mesmo não ocorre quando consideramos apenas os esteroides (53% compartilhados com *C. amazonicus* e 16% com *C. lemniscatus*). A maior parte dos compostos lipídicos compartilhados por *T. teguixin* e *C. lemniscatus* foram ésteres de ácidos graxos e aldeídos, que não foram identificados em *C. amazonicus*. O ergosterol e o lanosterol foram encontrados em grandes quantidades em *C. lemniscatus* e não foram identificados nas espécies de Tupinambinae, assim como o cholest-2-ene foi identificado apenas em *T. teguixin*, o cholestan-3-ol apenas em *C. amazonicus* e as duas espécies de Tupinambinae compartilharam elevadas quantidades de 3-Methoxy-Cholest-5-ene. Na DISCUSSÃO GERAL as três espécies de Teiidae deste capítulo serão também comparadas com todas as espécies estudadas ao longo deste trabalho.

Padrão Proteico

Para as duas espécies de Tupinambinae (*T. teguixin* e *C. amazonicus*) não foi possível atingir a concentração de proteínas necessária para obter padrões proteicos de qualidade. Para *T. teguixin* apenas uma amostra, que não havia sido analisada por CG-MS, revelou bandas na coloração em prata (**Figura 17**).

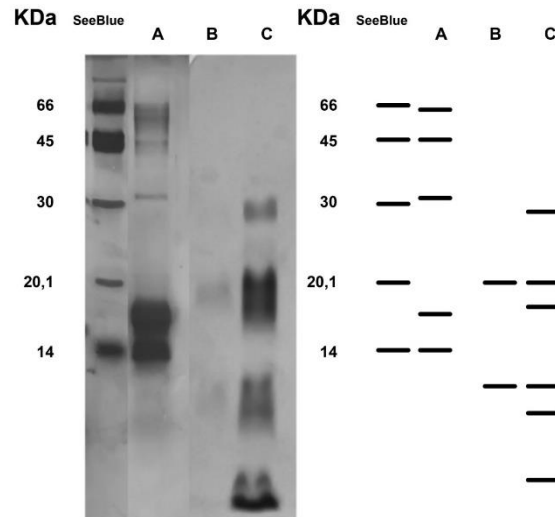


Figura 17. Imagem original da eletroforese em gel SDS-PAGE em coloração com nitrato de prata (esquerda) e mapa indicando as bandas proteicas que podem ser observadas no gel (direita) de um macho adulto de *Tupinambis teguixin* (A) e dois de *Cnemidophorus lemniscatus* (B e C).

Neste macho foram identificadas cinco bandas de proteínas, três com mais de 34 KDa e duas com menos de 19 KDa. Para *C. lemniscatus* foram identificadas seis bandas, todas com menos de 30 KDa (**Figura 17**). O macho de menor CRC apresentou apenas duas bandas (aproximadamente 20 KDa e 11 KDa) com intensidades inferiores as observadas no macho de maior CRC. *T. teguixin* e *C. lemniscatus* não compartilharam bandas de proteínas e só *T. teguixin* apresentou bandas com mais de 30 KDa e apenas *C. lemniscatus* apresentou bandas com menos de 14 KDa. Esses padrões serão comparados com os obtidos para *Ameiva ameiva*, três espécies de *Ameivula*, três espécies de *Kentropyx* e *Salvator merianae* na DISCUSSÃO GERAL.

Discussão Geral e Conclusões

No total, analisamos secreções femorais e pré-anais de três espécies de Tupinambinae (*Tupinambis teguixin*, *Salvator merianae* e *Crocodilurus amazonicus*), oito espécies de Teiinae (*Ameiva ameiva*, *Ameivula pyrrhogularis*, *Ameivula sp. nov. 1*, *Ameivula sp. nov. 2*, *Kentropyx pelviceps*, *K. calcarata*, *K. altamazonica* e *Cnemidophorus lemniscatus*) e seis espécies de Gymnophthalmidae (*Riolama sp. nov.*, *Iphisa elegans*, *Neusticurus medemi*, *Leposoma puk*, *L. scincoides* e *Loxopholis snethlageae*).

Com exceção de *Ameivula sp. nov. 1* e *C. lemniscatus*, analisamos a composição química da secreção femoral de fêmeas de todas as espécies de Teiidae citadas no parágrafo anterior que somaram 153 compostos lipídicos. O número de compostos identificados por fêmea variou entre nove (*C. amazonicus*) e 50 (*K. pelviceps*). As três espécies de Tupinambinae somaram 52 compostos e apenas 6% foram compartilhados por *C. amazonicus*, *T. teguixin* e *S. merianae*. Quando comparamos apenas as fêmeas de *S. merianae* e *T. teguixin*, gêneros irmãos (HARVEY *et al.*, 2012; GOICOECHEA *et al.*, 2016), 37% dos compostos foram compartilhados. Entre os Teiinae, foram identificados 142 compostos lipídicos e 11% foram compartilhados por todas as espécies. Fêmeas das três espécies de *Kentropyx* somaram 115 compostos, sendo 28% dos compostos. *K. calcarata* compartilhou 48% do total de compostos com a espécie irmã *K. pelviceps* (GOICOECHEA *et al.*, 2016) e 28% com *K. altamazonica*. *Kentropyx pelviceps* e *K. altamazonica* compartilham 37% do total de compostos identificados no gênero. *Ameivula pyrrhogularis* e *A. ameiva* compartilharam 34% dos 67 compostos identificados nas duas espécies. Em *A. pyrrhogularis* e *Kentropyx*, 16% dos 129 compostos identificados foram compartilhados. *Kentropyx* e *A. ameiva* somaram 131 compostos e compartilham 27% desse total.

Sobre as glândulas femorais de fêmeas de Teiidae sabemos apenas que em *A. ameiva* não há dimorfismo sexual no diâmetro e número dos poros (IMPARATO *et al.*, 2007) e que, em cativeiro, fêmeas de *S. merianae* não apresentam cilindros de secreção (CHAMUT *et al.*, 2009). Nossos resultados demonstram que é possível extrair secreção de fêmeas de Teiidae e que elas apresentam uma composição complexa de compostos lipídicos que podem ser importantes em contextos sociais, convergindo com hipóteses formuladas a partir da observação de casos de necrofilia em *S. merianae* e *A. ameiva*

(COSTA *et al.*, 2010; SAZIMA, 2015). Os trabalhos que caracterizaram quimicamente as secreções femorais de fêmeas são escassos (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b) e apresentam apenas seu perfil químico e diferenças com o perfil dos machos (LÓPEZ & MARTÍN, 2005b; KHANNOON *et al.*, 2011a; GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b; MARTÍN *et al.*, 2016b). Não há na literatura um estudo comparativo avaliando o potencial da composição das secreções femorais de fêmeas na identificação de espécies. De forma qualitativa, notamos que a similaridade entre as espécies nos permite uma distinção entre Tupinambinae e Teiinae, embora seja pouco eficiente para entender as relações entre os gêneros de cada subfamília. Para as espécies de *Kentropyx*, as duas espécies irmãs compartilham entre si maior porcentagem de compostos do que compartilham com *K. altamazonica* (GOICOECHEA *et al.*, 2016), embora o perfil completo não tenha apresentado diferenças estatísticas (CAPÍTULO 4). Ainda comparando com a filogenia (GOICOECHEA *et al.*, 2016), seria esperado que *Ameivula* compartilhasse maior similaridade com *Kentropyx* do que com *Ameiva*, porém isso não foi observado.

Com exceção de uma fêmea de *K. pelviceps*, todas as fêmeas apresentaram colesterol em suas secreções femorais (TIC entre 1,28% e 65,14%), nove fêmeas apresentaram grandes quantidades de compostos odoríferos (ácidos graxos e/ou ésteres) (BAECKENS *et al.*, 2017) e muitas fêmeas apresentaram significativas quantidades de campesterol e de cholest-4-en-3-one. Ao longo dos capítulos discutimos sobre a influência do *status* reprodutivo na composição lipídica das secreções femorais de fêmeas e comparando todas as espécies, confirmamos a tendência observada previamente de que fêmeas com ovos ou evidência de desova recente apresentam maiores quantidades de compostos odoríferos e fêmeas com folículos vitelogênicos apresentam maiores quantidades de esteroides, incluindo o cholest-4-en-3-one, que pode estar associado com a redução de corpos adiposos (SUZUKI *et al.*, 1998). Neste trabalho mostramos que fêmeas de Teiidae produzem secreção femoral e que apresentam diferenças que podem ser importantes tanto do ponto de vista da compreensão das relações filogenéticas, quanto de interações sociais (como, por exemplo, indicar para os machos seu *status* reprodutivo). Um último aspecto das fêmeas de Teiidae, que converge com o observado em muitos lagartos (COLE, 1966; ALBERTS, 1990), é a menor quantidade de secreção obtida quando comparada aos machos. A baixa quantidade de material, dificultou as metodologias de extração, interferindo diretamente na qualidade dos resultados obtidos e no número de amostras

a serem comparadas. O aumento da amostragem de fêmeas nos permitirá compreender como o *status* reprodutivo pode estar de fato interferindo na composição lipídica de diferentes espécies e em quais contextos sociais as secreções femorais de fêmeas são importantes.

Ao contrário do observado para as fêmeas, há uma série de informações na literatura sobre a composição química das secreções femorais de machos. Conhecemos a composição lipídica de diversas espécies de Lacertidae (LÓPEZ & MARTÍN, 2005b; GABIROT *et al.*, 2008; WELDON *et al.*, 2008; GABIROT *et al.*, 2010 e 2012; BAECKENS *et al.*, 2017) e algumas espécies de outras famílias (ALBERTS *et al.*, 1992b; ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003; LOUW *et al.*, 2007; KHANNOON, 2012; MARTÍN *et al.*, 2016b; ZOZAYA *et al.*, 2019). Alguns estudos demonstraram fatores que influenciam a composição química das secreções, seu papel no isolamento reprodutivo e na identificação de complexos crípticos de espécies e sua função em diferentes contextos sociais. Antes da realização deste trabalho, *S. merianae* era a única espécie de Teiidae, e de ocorrência no Brasil, para qual existiam informações sobre a composição lipídica da secreção femoral (MARTÍN *et al.*, 2011). Apresentamos informações inéditas para machos de dez espécies de Teiidae. Nos capítulos anteriores apresentamos resultados que mostram a influência das condições ambientais na composição lipofílica da secreção femoral de indivíduos de *A. ameiva* provenientes da Caatinga e da Amazônia, de diferenças de dieta e *status* reprodutivo em *S. merianae*, comparando o perfil químico de animais de vida livre com os de cativeiro de MARTÍN e colaboradores (2011) e o potencial informativo das secreções femorais na compreensão de complexos crípticos de espécies de *Ameivula*. Discutimos ainda potenciais funções de alguns dos compostos lipídicos identificados nos machos de Teiidae, indicando aspectos interessantes que podem guiar experimentos comportamentais futuros.

Todos os 90 machos, representando 10 espécies de Teiidae, apresentaram colesterol em sua secreção femoral, que variou entre 1,54% (*Ameivula sp. nov. 1*) e 48,64% (*T. teguixin*). Esse resultado revela que a ausência de colesterol em machos de cativeiro de *S. merianae* não é um evento natural entre os Teiidae. ESCOBAR e colaboradores (2003) apresentaram a hipótese de que o colesterol age como matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos, sendo encontrado em maiores quantidades em populações submetidas a temperaturas mais elevadas. Nossas amostras são

provenientes, principalmente, da Amazônia e da Caatinga, dois domínios morfoclimáticos que apresentam elevada temperatura, porém que diferem em termos de umidade (CAPÍTULO 1). A quantidade de colesterol obtido nas amostras dos dois domínios, excluindo as espécies como fator, não revelou diferenças estatísticas entre eles (Kruskal-Wallis: $p = 0,9$). Também não foram observadas diferenças na quantidade de colesterol entre as espécies (Kruskal-Wallis: $p = 0,08$) e em nenhuma espécie observamos forte correlação entre a porcentagem de colesterol e o tamanho corporal. É pouco provável que em Teiidae o colesterol esteja funcionando apenas como matriz não reativa, ainda mais quando levamos em consideração que *A. ameiva* e *S. merianae* apresentam uma camada epitelial ao redor dos cilindros de secreção que conferem maior estabilidade aos semioquímicos (IMPARATO *et al.*, 2007; CHAMUT *et al.*, 2009), mas estudos comportamentais, assim como a caracterização química da secreção de machos subadultos, são necessários para elucidar qual o papel funcional desses esteroides em Teiidae.

Como era esperado, com base nos dados disponíveis para *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), foram encontradas significativas quantidades de ácidos graxos de 16 e 18 carbonos em machos de Teiidae. O ácido esteárico, responsável por mais de 55% da secreção femoral de machos de *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), representou menos de 24% nas demais espécies de Teiidae, sendo observado em quantidades tão elevadas (59%) apenas em machos de *S. merianae* de vida livre. O ácido oleico, que não foi previamente identificado em *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), foi identificado em pequenas porcentagens em machos de vida livre da espécie (TIC < 3%), mas chegou a representar 42% da secreção de um macho de *A. ameiva*. O ácido linoleico, que representa mais de 20% da secreção de *S. merianae* em cativeiro (MARTÍN *et al.*, 2011), foi o ácido menos abundante nos Teiidae estudados neste trabalho, com exceção dos machos de *A. ameiva* da Caatinga. O ácido palmítico, que representou cerca de 7% da secreção de *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), foi o ácido graxo mais abundante em muitas amostras das três espécies de *Ameivula*. As potenciais funções desses ácidos em cada uma das espécies foram discutidas em detalhes nos capítulos anteriores, assim como este padrão não ser comum entre lagartos. É curioso que o macho de *T. teguixin*, os dois machos *C. lemniscatus* e alguns machos de cada uma das outras espécies, não apresentaram esses quatro ácidos em sua secreção femoral, ou o apresentaram em porcentagens muito baixas. Os trabalhos de caracterização química de machos

utilizaram espécies com ciclo reprodutivo conhecido e obtiveram as secreções durante a estação reprodutiva, especialmente no seu início. Para as dez espécies de Teiidae aqui estudadas, há pouca informação sobre aspectos ecológicos, porém as informações disponíveis indicam que a maioria dos Teiidae brasileiros apresentam reprodução prolongada ou, até mesmo, contínua (VITT, 1982; COLLI, 1991; VITT & COLLI, 1994; PIANKA & VITT, 2003; IMPARATO *et al.*, 2007; ROCHA, 2008). Isso possibilita que em uma mesma localidade e na mesma semana podemos encontrar indivíduos em diferentes momentos do estado reprodutivo. Levando em consideração que os ácidos graxos são compostos odoríferos e que aumentam a volatilidade das marcações químicas, aumentando assim seu alcance (ALBERTS, 1992; BAECKENS *et al.*, 2017), é possível que a quantidade de ácidos graxos em machos de Teiidae estejam relacionadas com diferentes momentos de seus respectivos ciclos reprodutivos, que apresenta variação entre indivíduos da mesma espécie.

Foram identificados 176 compostos lipídicos em machos das 10 espécies de Teiidae, apenas três compostos foram identificados em todas as espécies e oito em todos os gêneros. Sessenta e sete compostos (38%) foram identificados em, pelo menos, uma espécie de cada subfamília. As duas espécies de Tupinambinae somaram 74 compostos lipídicos e apenas 10 (13,5%) foram identificados em *S. merianae* e *T. teguixin*. Em Teiinae foram identificados 168 compostos e apenas 19 (11,5%) foram identificados em *Kentropyx*, *Ameivula*, *Ameiva* e *Cnemidophorus*. O baixo número de compostos compartilhados entre ou dentro de cada subfamília deve-se ao fato de que o macho de *T. teguixin* e os dois machos de *C. lemniscatus* apresentaram baixo número de compostos identificados. Excluindo *C. lemniscatus*, os Teiinae somaram 166 compostos, sendo 49 (29,5%) compartilhados por *Kentropyx*, *Ameiva* e *Ameivula*. *Kentropyx* e *Ameivula* somaram 143 compostos e compartilharam 61 (43%) e *Kentropyx* e *Ameiva* somaram 127 compostos e compartilharam 59 (46,5%). *Ameivula* e *Ameiva* somaram 148 compostos e compartilharam 61 (41%). As espécies de *Ameivula* somaram 113 compostos, sendo 44 (39%) compartilhados pelas três. *Ameivula sp. nov. 1* compartilhou 57 (50,5%) compostos com *Ameivula sp. nov. 2* e 56 (49,5%) com *A. pyrrhogularis*. *Ameivula sp. nov. 2* e *A. pyrrhogularis* compartilharam 44 (44%). Avaliando a similaridade (presença/ausência) dos compostos lipídicos entre as espécies através da UPGMA observamos que *A. ameiva* é a espécie que apresenta maior diferença em relação as demais e que as outras nove espécies apresentam uma

divisão entre Amazônia e Caatinga. O fenograma resultante não apresentou quaisquer semelhanças com as relações de parentesco das espécies (GOICOECHEA *et al.*, 2016).

Essa comparação revela aspectos interessantes das secreções femorais de machos de Teiidae. Quando em presença dos *A. ameiva* da Caatinga, *A. pyrrhogularis* apresenta maior similaridade com *Ameivula sp. nov. 1*, mesma relação indicada pelos dados moleculares (RECODER e ARIAS em comunicação pessoal), porém quando os *A. ameiva* são tratados como um único grupo, *A. pyrrhogularis* apresenta maior similaridade com *Ameivula sp. nov. 2*. Para *A. ameiva* essa distância entre os machos da Caatinga e da Amazônia, quando em presença de outras espécies de Teiidae, reforça ainda mais as diferenças consequentes das condições climáticas (CAPÍTULO 1). Mesmo em presença das outras espécies, *Ameivula* apresenta-se como um agrupamento coeso. As incongruências nos dois fenogramas representam mais uma evidência da complexidade das relações interespecíficas de *Ameivula* (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A divisão entre espécies da Caatinga (mais *S. merianae*) e da Amazônia, indica que as condições ambientais podem ter de fato grande influência na composição química das secreções femorais de Teiidae, assim como acontece com outras espécies de lagartos (ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003; BAECKENS *et al.*, 2017). É interessante ressaltar que o fenograma mostrou maior similaridade entre *K. calcarata*, *T. teguixin* e *C. lemniscatus*, que foram as amostras que apresentaram menor número de compostos identificados. Essa proximidade é, provavelmente, reflexo da quantidade de amostra e da qualidade das análises de CG-MS, do que de características reais de suas secreções.

Nosso conhecimento sobre as proteínas nas secreções femorais de lagartos ainda é pequeno (MANGIACOTTI *et al.*, 2017) e as comparações de perfis proteicos são realizadas seguindo o princípio de que duas bandas de mesmo tamanho correspondem ao mesmo componente proteico (ALBERTS, 1991). *Ameiva ameiva*, *S. merianae*, três espécies de *Ameivula*, três de *Kentropyx*, *C. lemniscatus*, *T. teguixin* e *Aspidoscelis tigris* (ALBERTS, 1991) somam 34 bandas entre 6 e 59 KDa e grande diversidade de componentes proteicos com menos de 17 KDa. Comparando a matriz de similaridade dos componentes proteicos com a relação filogenética entre essas espécies (GOICOECHEA *et al.*, 2016), não foi possível identificar componentes proteicos que sejam exclusivos de agrupamentos supra genéricos. Análises UPGMA, realizadas com todos os indivíduos ou apenas com os machos, não recuperaram agrupamentos

convergentes com a filogenia molecular (GOICOECHEA *et al.*, 2016). Quando realizada a UPGMA excluindo as duas espécies de Tupinambinae e as três espécies de *Kentropyx*, o fenograma obtido é similar à filogenia apresentando a seguinte relação de similaridade entre os gêneros (*Ameiva ameiva* (*Aspidoscelis* (*Cnemidophorus* + *Ameivula*))), sendo que os indivíduos de *A. ameiva* da Caatinga apresentaram maior similaridade com os demais gêneros do que os indivíduos da Amazônia.

Em *Podarcis muralis* (Lacertidae) não foram observadas bandas entre 24 e 32 KDa, que são bem representadas nos Iguanidae, levando os autores a interpretarem esse fato como consequência da distância filogenética entre as duas famílias (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Os Teiidae são filogeneticamente próximos aos Lacertidae, mas distantes dos Iguanidae (PYRON *et al.*, 2013) e, com exceção de *Tupinambis teguixin*, todas as espécies de Teiidae apresentaram bandas dentro deste intervalo, incluindo uma banda de 20 KDa que foi identificada em todos os gêneros de Teiinae. Nossos resultados, quando confrontados com as informações anteriores, demonstram a importância de se ampliar a diversidade de espécies analisadas para que possamos compreender as verdadeiras diferenças nos componentes proteicos de grandes agrupamentos filogenéticos. Proteínas nas secreções femorais podem apresentar significativa variação entre indivíduos (ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1993), populações (MANGIACOTTI *et al.*, 2017) e morfotipos (MANGIACOTTI *et al.*, 2019), mas são constantes ao longo do ano (ALBERTS *et al.*, 1993). Assim como para todas as espécies já estudadas, em Teiidae não identificamos dois indivíduos com perfis proteicos idênticos, suportando a hipótese de cada indivíduo tem seu próprio perfil que pode ser utilizado no reconhecimento individual (ALBERTS, 1990). Lagartos poderiam obter informações mais genéricas de compostos lipofílicos e posteriormente obter informações mais detalhadas acerca de identidade do emissor (ALBERTS *et al.*, 1992a), que são mais estáveis e permanecem mais tempo no meio (WYATT, 2014b). Um aspecto técnico da análise da composição proteica refere-se às bandas com menos de 14 KDa, que apresentam grande diversidade nos Iguanidae e nos Teiidae. Bandas abaixo desse valor foram excluídas dos resultados de *P. muralis* por poderem apresentar contaminantes lipídicos (MANGIACOTTI *et al.*, 2017), mas foram apontadas como particularmente importantes para o reconhecimento individual de Iguanidae (ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1993). Uma nova análise UPGMA realizada

removendo os componentes abaixo dos 14 KDa não apresentou diferenças significativas com as realizadas com a totalidade dos componentes proteicos de Teiidae.

Antes da realização deste trabalho, informações sobre a composição proteica de secreções femorais de espécies de Teiidae eram conhecidas para apenas dois machos de *Aspidoscelis tigris* (ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1993). Nossos resultados fornecem as primeiras informações comparativas para os componentes proteicos das secreções de Teiidae e demonstram que as espécies da família apresentam grau de variabilidade compatível com a utilização dessas informações para o reconhecimento individual. Embora as análises UPGMA não tenham recuperado as relações filogenéticas entre as duas subfamílias de Teiidae, mostram-se mais efetivas quando comparamos agrupamentos mais inclusivos. É importante ressaltar que as comparações realizadas apenas com base no peso molecular de cada componente proteico apresenta significativas limitações e podem estar mascarando diferenças e forçando similaridades. Para compreendermos o papel funcional das proteínas nas secreções de lagartos, assim como suas relações filogenéticas, precisamos dar início à realização de experimentos comportamentais isolando esses componentes e ampliar o número de espécies de diferentes famílias analisadas.

As relações de parentesco entre Gymnophthalmidae e Teiidae são reconhecidas há décadas (ESTES *et al.*, 1988; PYRON *et al.*, 2013; GOICOECHEA *et al.*, 2016). As seis espécies de Gymnophthalmidae somaram 102 compostos lipídicos, mas para as comparações com Teiidae, optamos por excluir as amostras de *Loxopholis snethlageae*, por terem apresentado número muito baixo de compostos, totalizando assim 98 compostos na família. As duas famílias somaram 205 compostos lipídicos, 106 compostos (52%), principalmente odoríferos como, por exemplo, ácidos graxos, ésteres e aldeídos (BAECKENS *et al.*, 2017), foram identificados exclusivamente em espécies de Teiidae. Vinte e oito compostos (14%) foram identificados apenas em Gymnophthalmidae e correspondem basicamente a esteroides. O fenograma gerado pela UPGMA não convergiu com as relações filogenéticas entre os gêneros das duas famílias. Os Gymnophthalmidae aparecem incluídos no agrupamento dos Teiidae da Amazônia e compartilham maior similaridade com as amostras de Teiidae com menor número de compostos identificados (*C. lemniscatus*, *T. teguixin* e *K. calcarata*). Esses resultados podem tanto representar a influência das condições climáticas nas secreções

das duas famílias, como podem ser apenas reflexo de baixa amostragem e problemas metodológicos na análise de CG-MS.

Os resultados apresentados ao longo deste trabalho representam informações inéditas acerca da composição química de espécies de lagartos da família Teiidae, além de informações iniciais para espécies de Gymnophthalmidae que podem guiar futuros estudos. Mostramos que os Teiidae apresentam complexidade química em suas secreções femorais, que podem sofrer influência de condições climáticas e da história evolutiva, e abrimos o caminho para que novos estudos sejam realizados acerca das interações químicas em espécies brasileiras de lagartos. As informações apresentadas ao longo deste trabalho indicam a necessidade de ampliarmos o nosso conhecimento sobre a ecologia das espécies brasileiras para melhoria das interpretações dos perfis químicos de Teiidae. A continuidade deste trabalho envolverá a identificação química dos componentes proteicos, o aumento da amostragem de espécies de Teiidae e a elaboração de uma metodologia para que possamos incluir as informações químicas (qualitativas e quantitativas) em análises filogenéticas.

Resumo

As interações químicas desempenham um papel essencial em diversas interações sociais de lagartos e são mediadas por compostos químicos presentes, principalmente, em suas glândulas femorais e pré-anais. O número de trabalhos caracterizando a composição química da secreção de glândulas femorais e pré-anais, assim como buscando identificar seu papel funcional em contextos sociais, tem aumentado nas últimas décadas. Embora a literatura sobre o tema seja extensa, os dados para espécies neotropicais são raros e para espécies que ocorrem no Brasil, há apenas informação para machos de *Salvator merianae*. Buscando ampliar o conhecimento sobre a composição química da secreção femoral de lagartos neotropicais, este trabalho caracterizou quimicamente a secreção de 11 espécies de Teiidae e seis de Gymnophthalmidae. Foram identificados 205 compostos, sendo 28 exclusivos de Gymnophthalmidae e 106 exclusivos de Teiidae. Demonstramos a influência das condições ambientais na secreção femoral de machos de *Ameiva ameiva* provenientes da Amazônia e da Caatinga, diferenças entre a composição química da secreção de machos de *S. merianae* de vida livre e de cativeiro, o papel da composição química da secreção de machos de três espécies de *Ameivula* na compreensão de um potencial complexo críptico de espécies e diferenças em machos de duas espécies de *Kentropyx* que podem estar associadas com o uso de substrato. Apresentamos a hipótese de que o *status* reprodutivo pode ter influência direta na composição química de machos e fêmeas, revelando um problema no estudo da composição química de espécies de Teiidae para as quais faltam dados acerca do ciclo reprodutivo e/ou apresentam reprodução prolongada/contínua. Em relação ao que era conhecido para *S. merianae*, validamos a grande quantidade de ácidos graxos como uma característica das espécies de Teiidae e identificamos, pela primeira vez, colesterol em todas as amostras analisadas. Este trabalho validou as espécies de Teiidae como um excelente modelo para os estudos das interações químicas em lagartos neotropicais e o potencial informativo da composição química das secreções femorais para melhor compreensão da ecologia e dos eventos evolutivos das linhagens de Teiidae.

Palavras-chave. Comunicação química, lagartos neotropicais, semioquímicos.

Abstract

Chemical interactions play an essential role in different social interactions of lizards and are mediated by chemical compounds present, mainly, in their femoral and preanal glands. The number of studies characterizing the chemical composition of femoral and preanal gland secretions, as well as trying to identify their functional role in social contexts, has increased in recent decades. Although the literature on the chemical communication in lizards is extensive, data for neotropical species are rare and for Brazilian species, there is only information for males of *Salvator merianae*. The main goal of this work is to expand the knowledge on the chemical composition of femoral secretion of neotropical lizards. We chemically characterized the femoral and preanal secretion of 11 species of Teiidae and six of Gymnophthalmidae. We identified a total of 205 compounds, 28 exclusively in Gymnophthalmidae and 106 exclusively in Teiidae. We demonstrated the influence of the environmental condition on the femoral gland secretion of males of *Ameiva ameiva* from Amazonia and Caatinga, differences between chemical composition of femoral gland secretion of free-living and captive *S. merianae*, the role of the chemical composition in understanding a potential cryptic complex of *Ameivula* and differences in males of two species of *Kentropyx* that may be associated with substrate use. We hypothesized that reproductive status may have a direct influence on the chemical composition of femoral gland secretions of males and females, revealing a problem in the study of the chemical composition of Teiidae species that lack information about their reproductive cycle and/or show prolonged/continuous reproduction. Regarding what was known for *S. merianae*, we validated the large amount of fatty acids as a characteristic of the species of Teiidae and, for the first time, identified cholesterol for a Teiidae species. This work validated the Teiidae species as an excellent model for the study of the chemical interactions in neotropical lizards and the potential informative of the chemical composition of femoral gland secretions to better understand the ecology and evolutionary events of Teiidae lineages.

Keywords. Chemical communication, neotropical lizards, semiochemicals.

Referências Bibliográficas

- Aebischer, N.J., P.A. Robertson & R.E. Kenward. 1993. *Compositional analysis of habitat use from animal radio-tracking data*. Ecology, 74: 1313–1325.
- Alberts, A.C. 1989. *Ultraviolet visual sensitivity in desert iguanas: implications for pheromone detection*. Animal Behaviour, 38: 129–137.
- Alberts, A.C. 1990. *Chemical properties of femoral gland secretions in the desert iguana, Dipsosaurus dorsalis*. Journal of Chemical Ecology, 16(1): 13–25.
- Alberts, A.C. 1991. *Phylogenetic and adaptive variation in lizard femoral gland secretions*. Copeia, 1: 69–79.
- Alberts, A.C. 1992. *Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates*. The American Naturalist, 139: S62–S89.
- Alberts, A.C. 1993. *Chemical and behavioral studies of femoral gland secretions in iguanid lizards*. Brain, Behavior and Evolution, 41: 255–260.
- Alberts, A.C., N.C. Pratt & J.A. Phillips. 1992a. *Seasonal productivity of lizard femoral glands: relationship to social dominance and androgen levels*. Physiology and Behavior, 51: 729–733.
- Alberts, A.C., T.R. Sharp, D.I. Werner P.J. Weldon. 1992b. *Seasonal variation of lipids in femoral gland secretions of male green iguanas (Iguana iguana)*. Journal of Chemical Ecology, 18(5): 703–712.
- Alberts, A.C., J.A. Phillipis & D.I. Werner. 1993. *Sources of Intraspecific Variability in the Protein Composition of Lizard Femoral Gland Secretions*. Copeia, 3: 775–781.
- Amo, L., P. López & J. Martín. 2004. *Chemosensory recognition and behavioral responses of wall lizards, Podarcis muralis, to scents of snakes that pose different risks of predation*. Copeia, 2004(3): 691–696.
- Anderson, M.J. 2001. *A new method for non-parametric multivariate analysis of variance*. Austral Ecology, 26: 32–46.
- Anderson, M.J. & T.J. Willis. 2003. *Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination ecology*. Ecology, 84: 511–525.
- Andrade, D.V., C. Sanders, W.K. Milsom & A.S. Abe. 2004. *Overwintering in tegu lizards*. Twelfth International Hibernation Symposium, 27: 339–348.

- Aragón, P., P. López & J. Martín. 2001. *Discrimination of femoral gland secretions from familiar and unfamiliar conspecifics by male Iberian rock-lizards, Lacerta monticola*. Journal of Herpetology, 35(2): 346–350.
- Aragón, P., P. López & J. Martín. 2008. *Increased predation risk modifies lizard scent-marks chemicals*. Journal of Experimental Zoology, 309A: 427–433.
- Arias, F., C.M. de Carvalho, M.T. Rodrigues & H. Zaher. 2011. *Two new species of Cnemidophorus (Squamata: Teiidae) of the C. ocellifer group, from Bahia, Brazil*. Zootaxa, 3022: 1–21.
- Arias, F.J., M. Teixeira Junior, R. Recoder, C.M. de Carvalho, H. Zaher & M.T. Rodrigues. 2014a. *Whiptail lizards in South America: a new Ameivula (Squamata, Teiidae) from Planalto dos Gerais, Eastern Brazilian Cerrado*. Amphibia-Reptilia, 35: 227–242.
- Arias, F.J., C.M. Carvalho, H. Zaher & M.T. Rodrigues. 2014b. *A new species of Ameivula (Squamata, Teiidae) from Southern Espinhaço Mountain Range, Brazil*. Copeia, 2014(1): 95–105.
- Arias, F.J., R. Recoder, B.B. Álvarez, E. Ethcepare, M. Quipildor, F. Lobo & M.T. Rodrigues. 2017. *Diversity of teiid lizards from Gran Chaco and Western Cerrado (Squamata: Teiidae)*. Zoolooczvca Scripta, 2018: 1–15.
- Ávila-Pires, T.C.S. 1995. *Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata)*. Zoologische Verhandelingen Leiden 299: 1–706.
- Baeckens, S., S. Edwards, K. Huyghe & R. Van Damme. 2015. *Chemical signaling in lizards: an interspecific comparison of femoral pore number in Lacertidae*. Biological Journal of the Linnean Society, 114: 44–57.
- Baeckens, S., J. Martín, R. García-Roa, P. Pafilis, K. Huyghe & R. Van Damme. 2017. *How environmental conditions shape the chemical signal design of lizards*. Functional Ecology, 2017: 1–15.
- Barbosa, D., E. Font, E. Desfilis & M.A. Carretero. 2006. *Chemically mediated recognition in closely related Podarcis wall lizards*. Journal of Chemical Ecology, 32: 1587–1598.
- Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G. & P.M. Gresshoff. 1991. *Fast and sensitive staining of DNA in polyacrylamide gels*. Analytical Biochemistry, 196: 80–83.
- Basto da Silva, M. & T.C.S. Ávila-Pires. 2013. *The genus Cnemidophorus (Squamata: Teiidae) in State of Piauí, northeastern Brazil, with description of a new species*. Zootaxa, 3681(4): 455–477.

- Baxi, K.N., K.M. Dorries & H.L. Eisthen. 2006. *Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones?* Trends in Neurosciences, 29(1): 1–6.
- Becker, E.A., S. Petrino & C.A. Marler. 2012. *A comparison of scent marking between a monogamous and promiscuous species of Peromyscus: pair bonded males do not advertise to novel females.* PLoS ONE, 7: e32002.
- Bissinger, B.E. & C.A. Simon. 1979. *Comparison of tongue extrusion in representatives of six families of lizards.* Journal of Herpetology, 13(2): 133–139.
- Bofill, M.E. & Lewis, A.R. 1999. *Detection of socially relevant chemical cues by the Teiid lizard Ameiva exsul.* Journal of Herpetology, 33 (4): 713–715.
- Bossert, W.H. & D.O. Wilson. 1963. *The analysis of olfactory communication among animals.* Journal of Theoretical Biology, 5: 443–469.
- Bull, C.M., C.L. Griffin & G.R. Johnston. 1999a. *Olfactory discrimination in scarpiling lizards.* Behavioral Ecology, 10: 136–140.
- Bull, C.M., C.L. Griffin & M.V. Perkins. 1999b. *Some properties of a pheromone allowing individual recognition, from the scats of an Australian lizard, Egernia striolata.* Acta Ethologica, 2: 35–42.
- Burr G.O., M.M. Burr & E. Miller. 1930. *On the nature of the fatty acids essential in nutrition.* The Journal of Biological Chemistry, 86: 587–621.
- Butenandt, A., R. Beckmann & E. Hecker. 1961. *Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners, I. Der biologische Test und die Isolierung des reinen Sexuallockstoffes Bombykol.* Biological Chemistry, 324(1): 71–83.
- Caldironi H.A. & M.E. Manes. 2006. *Proximate composition, fatty acids and cholesterol content of meat cuts from tegu lizard Tupinambis merianae.* Journal of Food Composition and Analysis, 19: 711–714.
- Carazo, P., E. Font & E. Desfilis. 2007. *Chemosensory assessment of rival competitive ability and scent-mark function in a lizard, Podarcis hispanica.* Animal Behaviour, 74: 895–902.
- Caro, S.P. & J. Balthazart. 2010. *Pheromones in birds: myth or reality?* Journal of Comparative Physiology A, 196: 751–766.
- Censky, E.J. 1997. *Female mate choice in the non-territorial lizard Ameiva plei (Teiidae).* Behavioral Ecology and Sociobiology, 40, 221–225.
- Chamut, S., V.G. Valdez & M.E. Manes. 2009. *Functional morphology of femoral glands in the tegu lizard, Tupinambis merianae.* Zoological Science, 26(4): 289–293.

- Clark, R.W. 2007. *Public information for solitary foragers: timber rattlesnakes use conspecific chemical cues to select ambush sites*. Behavioral Ecology, 18(2): 487–490.
- Cole, C.J. 1966. *Femoral glands in lizards: a review*. Herpetologica, 22(3): 199–206.
- Colli, G.R. 1991. *Reproductive ecology of Ameiva ameiva (Sauria, Teiidae) in the Cerrado of Central Brazil*. Copeia, 1991(4): 1002–1012.
- Colli, G.R., J.P. Caldwell, G.C. Costa, A.M. Gainsbury, A.A. Garda, D.O. Mesquita, C.M.M.R. Filho, A.H.B. Soares, V.N. Silva, P.H. Valdujo, G.H.C. Vieira, L.J. Vitt, F.P. Werneck, H.C. Wiederhecker & M.G. Zatz. 2003. *A new species of Cnemidophorus (Squamata, Teiidae) from the Cerrado Biome in Central Brazil*. Occasional Papers, 14: 1–14.
- Colli, G.R., L.G. Giugliano, D.O. Mesquita & F.G.R. França. 2009. *A new species of Cnemidophorus from the Jalapão region, in the Central Brazilian Cerrado*. Herpetologica, 65(3): 311–327.
- Conrad, J.L. 2008. *Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology*. Bulletin of the American Museum of Natural History, 310: 1–182.
- Cooper, W.E. 1994. *Chemical discrimination by tongue-flicking in lizards: a review with hypothesis on its origin and its ecological and phylogenetic relationships*. Journal of Chemical Ecology, 20(2): 439–485.
- Cooper Jr., W.E. 1990. *Prey odor detection by teiid and lacertid lizards and the relationship of prey odor detection to foraging mode in lizard families*. Copeia, 1: 237–242.
- Cooper Jr., W.E. 1996. *Preliminary reconstructions of nasal chemosensory evolution in Squamata*. Amphibia-Reptilia, 17: 395–415.
- Cooper Jr. *Lizard chemical senses, chemosensory behavior, and foraging mode*. Em: Reilly, S.M., McBrayer, L.B. & Miles, D.B. Lizard Ecology, Cambridge University Press, 2007, 1^a Ed.
- Cooper Jr., W.E. & A.C. Alberts. 1990. *Tongue-flicking and biting in response to chemical food stimuli by an iguanid lizard (Dipsosaurus dorsalis) having sealed vomeronasal ducts: vomerolfaction may mediate these behavioral responses*. Journal of Chemical Ecology, 17(1): 135–146.
- Cooper Jr., W.E. & G. Burghardt. 1990. *A comparative analysis of scoring methods for chemical discrimination of prey by squamate reptiles*. Journal of Chemical Ecology, 16(1): 45–65.

- Cooper Jr., W.E., J.P. Cadwell, L.J. Vitt, V. Pérez-Mellado & T.A. Baird. 2002. *Food-chemical discrimination and correlated evolution between plant diet and plant-chemical discrimination in lacertiform lizards*. Canadian Journal of Zoology, 80(4): 655–663.
- Costa, H.C., E.T. Silva, P.S. Campos, M.P.C. Oliveira, A.V. Nunes & P.S. Santos. 2010. *The corpse bride: a case of Davian behaviour in the Green Ameiva (Ameiva ameiva) in southeastern Brazil*. Herpetology Notes, 3: 79–83.
- Costa, H.C., L.O. Drummond, J.F.R. Tonini & J. Zaldívar-Rae. 2013. *Kentropyx calcarata (Squamata: Teiidae): Mating behavior in the wild*. North-Western Journal of Zoology, 9 1): 198–200.
- Cowles, R.B. & R.L. Phelan. 1958. *Olfaction in rattlesnakes*. Copeia, 1958:77–83.
- Duvall, D. 1981. *Western fence lizard (Sceloporus occidentalis) chemical signals. A replication with naturally breeding adults and a test of the Cowles and Phelan hypothesis of rattlesnake olfaction*. Journal of Experimental Zoology, 218: 351–362.
- Duvall, D., B.M. Graves & G.C. Carpenter. 1987. *Visual and chemical composite signaling effects of Sceloporus lizards fecal boli*. Copeia, 1987: 1028–1031.
- Escobar, C.A., A. Labra & H.M. Niemeyer. 2001. *Chemical composition of precloacal secretions of Liolaemus lizards*. Journal of Chemical Ecology, 27(8): 1677–1690.
- Field, A. *Discovering statistics using SPSS*. 3^a edição. London, Sage Publication. 2009.
- Escobar, C.M., C.A. Escobar, A. Labra & H.M. Niemeyer. 2003. *Chemical composition of precloacal secretions of two Liolaemus fabiani populations: are they diferente?* Journal of Chemical Ecology, 29(3): 629–638.
- Estes, R., D.M. de Queiroz & J. Gauthier. *Phylogenetic relationships within Squamata*. Em: R. Estes & G. Pregil (Eds). Phylogenetic relationships of the lizard families. Stanford, Stanford University Press, 1988. pp. 119–281.
- Ferguson, B., S.D. Bradshaw & J.R. Cannon. 1985. *Hormonal control of femoral gland secretion in the lizard, Amphibolurus ornatus*. General and Comparative Endocrinology, 57: 371–376.
- Ferreira, S., S.V. Brito, J.G.M. Costa, R.R.N. Alves, H.D.M. Coutinho & W.O. Almeida. 2009. *Is the body fat of the lizard Tupinambis merianae effective against bacterial infections?* Journal of Ethnopharmacology, 126: 233–237.
- Font, E. & E. Desfilis. 2002. *Chemosensory recognition of familiar and unfamiliar conspecifics by juveniles of the Iberian wall lizard Podarcis hispanica*. Ethology, 108: 319–330.

- Font, E., D. Barbosa, C. Sampedro & P. Carazo. 2012. *Social behavior, chemical communication, and adult neurogenesis: studies of scent mark function in Podarcis wall lizards*. *General and Comparative Endocrinology*, 177: 9–17.
- Gabirot, M., P. López, J. Martín, M. de Fraipont, B. Heulin, B. Sinervo & J. Clobert. 2008. *Chemical composition of femoral secretions of oviparous and viviparous types of male common lizards Lacerta vivipara*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 539–544.
- Gabirot, M., A.M. Castilla, P. López & J. Martín. 2010. *Differences in chemicals signals may explain species recognition between an island lizard, Podarcis atrata, and related mainland lizards, P. hispanica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(2010): 521–528.
- Gabirot, M., P. López & L. Martín. 2012. *Differences in chemical sexual signals may promote reproductive isolation and cryptic speciation between Iberian Wall lizards populations*. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012: 1–13.
- Gabirot, M., P. López & J. Martín. 2013. *Female mate choice based on pheromone content may inhibit reproductive isolation between distinct populations of Iberian wall lizards*. *Current Zoology*, 59(2): 210–220.
- García-Roa, R., C. Cabido, P. López & J. Martín. 2016a. *Interspecific differences in chemical composition of femoral gland secretions between two closely related wall lizard species, Podarcis bocagei and Podarcis carbonelli*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64: 105–110.
- García-Roa, R., S. Carreira, P. López & J. Martín. 2016b. *Genders matters: sexual differences in chemical signals of Liolaemus wiegmanni lizards (Iguania, Liolaemidae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 69: 108–114.
- García-Roa, R., J. Sáiz, B. Gómara, P. López & J. Martín. 2017. *Dietary constraints can preclude the expression of an honest chemical sexual signal*. *Scientific Reports*, 7: 6073.
- Gillam, E. 2011. *An introduction to animal communication*. *Nature Education Knowledge*, 3(10): 70–75.
- Gilbert, R. & G.W. Uetz. 2019. *Male chemical cues as reliable indicators of infection in the wolf spider Schizocosa ocreata*. *Ethology*. doi:10.1111/eth.12841
- Giugliano, L.G., R.G. Collevatti & G.R. Colli. 2007. *Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 168–179.

- Giugliano, L.G., C.C. Nogueira, P.H. Valdujo, R.G. Collevatti & G.R. Colli. 2013. *Cryptic diversity in South American Teiinae (Squamata, Teiidae) lizards*. *Zoologica Scripta*, 42(5): 473–487.
- Goicoechea, N., D.R. Frost, I. de la Riva, K.C.M. Pellegrino, J. Sites Jr., M.T. Rodrigues & J.M. Padial. 2016. *Molecular systematics of teioid lizards (Teioidea/Gymnophthalmoidea: Squamata) based on the analysis of 48 loci under tree-alignment and similarity-alignment*. *Cladistics* (2016): 1–48.
- Graves, B.M. & M. Halpern. 1990. *Roles of vomeronasal organ chemoreception in tongue-flicking, exploratory and feeding behaviour of the lizard, Chalcides ocellatus*. *Animal Behaviour*, 39: 692–698.
- Halpern, M. & J.L. Kubie. 1983. *Snake tongue flicking behavior: clues to vomeronasal system functions*. Em: Silverstein, R.M. & D. Miller-Schwarze (eds.). *Chemical signals in vertebrates III*. Plenum Press, Nova Iorque.
- Harvey, M.B, G.N. Ugueto & R.L. Gutberlet Jr. 2012. *Review of Teiid morphology with a revised taxonomy and phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata)*. *ZOOTAXA*, 3459: 1–156.
- Heathcote, R.J.P., E. Bell, P. d'Etorre, G.M. While & T. Uller. 2014. *The scent of sun worship: basking experience alters scent mark composition in male lizards*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(5): 861–870.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones & A. Jarvis. 2005. *Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas*. *International Journal of Climatology*, 25: 1965–1978.
- Houck, L.D. 2009. *Pheromone communication in amphibians and reptiles*. *Annual Review of Physiology*, 71: 161–176.
- Imparato, B.A., M.M. Antoniazzi, M.T. Rodrigues & C. Jared. 2007. *Morphology of the femoral glands in the lizard Ameiva ameiva (Teiidae) and their possible role in semiochemicals dispersion*. *Journal of Morphology*, 268(7): 636–648.
- Iraeta, P., C. Monasterio, A. Salvador & J.A. Díaz. 2011. *Sexual dimorphism and interpopulation differences in lizard hind limb length: locomotor performance or chemical signaling?* *Biological Journal of the Linnean Society*, 104: 318–329.
- Johansson, B.G., & T.M. Jones. 2007. *The role of chemical communication in mate choice*. *Biological Reviews*, 82, 265–289.
- Kandutsch, A.A. 1963. *Metabolism of cholesta-4,7-dien-3-one and cholesta-4,6-dien-3-one by mouse liver microsomes*. *Journal of Lipid Research*, 4(2): 179–187.

- Kardong, K.V. *Vertebrates: Comparative anatomy, function, evolution*. 5^a edição. Nova Iorque, McGraw-Hill Primis. 2008.
- Karlson, P. & M. Luscher. 1959. 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 4653(3): 55–56.
- Khannoon, E.R. 2012. *Secretion of pre-anal glands of house-dwelling geckos (Family: Gekkonidae) contain monoglycerides and 1,3-alkanediol. A comparative chemical ecology study*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44(2012): 341–346.
- Khannoon, E.R., Flachsbarth, B., El-Gendy, A., Mazik, K., Hardege, J.D. & S. Schulz. 2011a. *New compounds, sexual differences, and age-related variations in the femoral gland secretions of the lacertid lizard Acanthodactylus boskianus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 95–101.
- Khannoon, E.R., A. El-Gendy & J.D. Hardege. 2011b. *Scent marking pheromones in lizards: cholesterol and long chain alcohols elicit avoidance and aggression in male Acanthodactylus boskianus*. *Chemoecology*, 21: 143–149.
- Khannoon, E.R., D.H. Lunt, S. Schulz & J.D. Hardege. 2013. *Divergence of scent pheromones in allopatric populations of Acanthodactylus boskianus (Squamata, Lacertidae)*. *Zoological Science*, 30(5): 380–385.
- Kok, P. 2015. *A new species of Pantepui endemic genus Riolama (Squamata: Gymnophthalmidae) from the summit of Murisipán-tepui, with the erection of a new gymnophthalmid subfamily*. *Zoological Journal of Linnean Society*, 174: 500–518.
- Kopena, R., P. López & J. Martín. 2014. *What are carotenoids signalling? Immunostimulatory effects of dietary vitamin E, but not of carotenoids, in Iberian green lizards*. *Naturwissenschaften*, 101(2): 1107–1114.
- Labra, A. 2011. *Chemical stimuli and species recognition in Liolaemus lizards*. *Journal of Zoology*, 285: 215–221.
- Labra, A., C.A. Escobar & H.M. Niemeyer. 2001. *Chemical discrimination in Liolaemus lizards: comparison of behavioral and chemical data*. *Chemical Signals in Vertebrates*, 9: 439–444.
- Labra, A., C.A. Escobar, P.M. Aguilar & H.M. Niemeyer. 2002. *Sources of pheromones in the lizard Liolaemus tenuis*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75:141–147.
- Laemmli, U.K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227 (5259): 680–685.

- Le Galliard, J., P.S. Fitzer, R. Ferrière & J. Clobert. 2005. *Sex ratio bias, male aggression, and population collapse in lizards*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 102, 18231–18236.
- Lide, D.R. & G.W.A. Milne. 1993. *Handbook of data on organic compounds*. 3^a Edição. CRC Press, Boca Raton, Flórida, Estados Unidos.
- Linklater, W.L., K. Mayer & R.R. Swaisgood. 2013. *Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros*. Animal Behavior, 85: 671–677.
- Lopes, H.R. & A.S. Abe. 1999. *Biologia reprodutiva e comportamento do teiu, Tupinambis teguixin, em cativoiro (Reptilia, Teiidae)*. Em: Manejo y conservación de fauna silvestre en América Latina, p. 259-274. Fang, T.G., O.L. Montenegro & R.E. Bodmer. Eds. La Paz: Instituto de Ecología.
- López, P. & J. Martín. 2002. *Chemical rival recognition decreases aggression levels in male Iberian wall lizards, Podarcis hispanica*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 51, 461–465.
- López, P. & J. Martín. 2005a. *Age-related differences in lipophilic compounds found in femoral gland secretions of male spiny-footed lizards, Acanthodactylus erythrurus*. Zeitschrift fur Naturforsch C, 60: 915–920.
- López, P. & J. Martín. 2005b. *Intersexual differences in chemical composition of precloacal gland secretions of the amphisbaenian Blanus cinereus*. Journal of Chemical Ecology, 31(12): 2913–2931.
- López, P. & J. Martín, 2009. *Potential chemosignals associated with male identity in the Amphisbaenian Blanus cinereus*. Chemical senses, 34: 479–486.
- López, P., P. Aragón & J. Martín. 1998. *Iberian rock lizards (Lacerta monticola cyreni) assess conspecific information using composite signals from faecal pellets*. Ethology, 104: 809–820.
- López, P. P. Aragón & J. Martín. 2003. *Responses of female lizards, Lacerta monticola, to males chemical cues reflect their mating preference for older males*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 55: 73–79.
- López, P., L. Amo & J. Martín. 2005. *Reliable signaling by chemical cues of male traits and health state in male lizards, Lacerta monticola*. Journal of Chemical Ecology, 32(2): 473–488.
- Losos, J.B., D.M. Hillis & H.W. Greene. 2012. *Who speaks with forked tongue?* Science, 338: 1428–1429.

- Louw, S., B.V. Burger, M. Le Roux & J.H. Van Wyk. 2007. *Lizard epidermal gland secretions I: chemical characterization of the femoral gland secretion of the sungazer, Cordylus giganteus*. Journal of Chemical Ecology, 33: 1806–1818.
- Louw, S., B.V. Burger, M. Le Roux & J.H. Van Wyk. 2011. *Lizard epidermal gland secretions II: chemical characterization of the generation gland secretion of the Sungazer, Cordylus giganteus*. Journal of Natural Products, 74: 1364–1369.
- Maderson, P.F.A. & K.W. Chiu. 1970. *Epidermal glands in Gekkonid lizards: evolution and phylogeny*. Herpetologica, 26(2): 233–238.
- Mangiacotti, M., Fumagalli, M., Scali, S., Zuffi, M.A.L., Cagnone, M., Salvini, R. & R. Zacchi. 2017. *Inter- and intra-population variability of the protein content of femoral gland secretions from a lacertid lizard*. Current Zoology, 63(6): 657–665.
- Mangiacotti, M., M. Fumagalli, M. Cagnone, S. Viglio, A.M. Bardoni, S. Scali & R. Zacchi. 2019. *Morph-specific protein patterns in the femoral gland secretions of a colour polymorphic lizard*. Scientific Reports, 9: 8412.
- Marques-Souza, S., I. Prates, A. Fouquet, A. Camacho, P.J.R. Kok, P.M.S. Nunes, F. Dal Vechio, R.S. Recoder, N. Mejia, M. Teixeira Jr., C. Barrio-Amorós, J. Cassimiro, J.D. Lima, M.A. de Sena & M.T. Rodrigues. 2018. *Reconquering the water: Evolution and systematics of South and Central American aquatic lizards (Gymnophthalmidae)*. Zoologica Scripta, 47:255–265.
- Martin, J. & P. López. 2000. *Chemoreception, symmetry and mate choice in lizards*. The Royal Society, 267: 1265–1269.
- Martín, J. & P. López. 2006a. *Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards*. Proceedings of Royal Society, 273: 2619–2624.
- Martín, J. & P. López. 2006b. *Age-related variation in lipophilic chemical compounds from femoral gland secretions of male lizards Psammmodromus algirus*. Biochemical Systematics and Ecology, 34: 691–697.
- Martín, J. & P. López. 2006c. *Links between male quality, male chemical signals, and female mate choice in Iberian Rock Lizards*. Functional Ecology, 20: 1087–1096.
- Martín, J. & P. López. 2007. *Scent may signal fighting ability in male Iberian rock lizards*. Biology Letters, 3: 125–127.
- Martín, J. & P. López. 2010a. *Multimodal sexual signals in male ocellated lizards Lacerta lepida: vitamin E in scent and green coloration may signal male quality in different sensory channels*. Naturwissenschaften, 97: 545–553.

- Martín, J. & P. López. 2010b. *Condition-dependent pheromone signaling by male rock lizards: more oily scents are more attractive*. *Chemical Senses*, 35: 253–262.
- Martín, J. & P. López. 2011. *Pheromones and reproduction in Reptiles*. Em: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Reptiles, 3. São Diego, California, Academic Press, pp. 141–167.
- Martín, J. & P. López. 2012. *Supplementation of male pheromone on rock substrates attracts female rock lizards to the territories of males: a field experiment*. *Plos One*, 7(1): 141–167.
- Martín, J. & P. López. 2013. *Effects of global warming on sensory ecology of rock lizards: increased temperatures alter the efficacy of sexual chemical signals*. *Functional Ecology*, 27: 1332–1340.
- Martín, J. & P. López. 2015. *Condition-dependent chemosignals in reproductive behavior of lizards*. *Hormones and Behavior*, 68: 14–24.
- Martín, J., E. Civantos, L. Amo & P. López. 2007. *Chemical ornaments of male lizards Psammmodromus algirus may reveal their parasite load and health state to females*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 173–179.
- Martín, J., L. Amo & P. López. 2008. *Parasites and health affect multiple sexual signals in male common wall lizards, Podarcis muralis*. *Naturwissenschaften*, 95: 293–300.
- Martín, J., I. Barja & P. López. 2010. *Chemical scent constituents in feces of wild Iberian wolves (Canis lupus signatus)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 1096–1102.
- Martín, J., S. Chamut, M.E. Manes & P. López. 2011. *Chemical constituents of femoral gland secretions of male Tegu lizards (Tupinambis merianae) (Family Teiidae)*. *Zeitschrift für Naturforsch*, 66c: 434–440.
- Martín, J., J. Ortega & P. López. 2013. *Lipophilic compounds in femoral secretions of male collared lizards, Crotaphytus bicinctores (Iguania, Crotaphytidae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 47: 5–10.
- Martín, J., J. Ortega & P. López. 2015a. *Interpopulational variations in sexual chemical signals of Iberian wall lizards may allow maximizing signal efficiency under different climatic conditions*. *PlosOne*, 10(6): e0131492.
- Martín, J., A. Martínez-Silvestre, P. López, A. Ibáñez, M.A. Rodríguez-Domínguez & I. Verdaguer. 2015b. *Lipophilic compounds in femoral secretions of males and females of the El Hierro giant lizard Gallotia simonyi (Lacertidae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61: 286–292.

- Martín, J., P. López, P. Iraeta, J.A. Díaz & A. Salvador. 2016a. *Differences in males' chemical signals between genetic lineages of the lizard Psammmodromus algirus promote male intrasexual recognition and aggression but not female mate preferences*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 70(10): 1657–1668.
- Martín, J., A.M. Castilla, P. López, M. Al-Jaidah, S.F. Al-Mohannadi & A.A.M. Al-Hemaidi. 2016b. *Chemical signals in desert lizards: Are femoral gland secretions of male and female spiny-tailed lizards, Uromastyx aegyptia microlepis adapted to arid conditions?* Journal of Arid Environments, 127: 192–198.
- Martins, M. 2006. *Life in the water: ecology of the jacararana lizard, Crocodilurus amazonicus*. Herpetological Journal, 16: 171–177.
- Mason, R.T. 1993. *Chemical ecology of the red-sided garter-snake, Thamnophis sirtalis parietalis*. Brain, Behavior and Evolution, 41: 261–268.
- Mason, R.T. & W.H.N. Gutzke. 1990. *Sex recognition in the leopard Gecko, Eublepharis macularis (Sauria: Gekkonidae). Possible mediation by skin-derived semiochemicals*. Journal of Chemical Ecology, 16(1): 27–36.
- Mason, R.T. & M.R. Parker. 2010. *Social behavior and pheromonal communication in reptiles*. Journal of Comparative Physiology A, 196: 729–749.
- Mason, R.T., H.M. Fales, T.H. Jones, L.K. Pannell, J.W. Chinn & D. Crews. 1989. *Sex pheromones in snakes*. Science. 241:290–293.
- Moreira, P.L., P. López & J. Martín. 2008. *Discrimination of conspecific faecal chemicals and spatial decisions in juvenile Iberian rock lizard (Lacerta monticola)*. Acta Ethologica, 11: 26–33.
- Morgans, L.F. & G.A. Heidt. 1978. *Comparative tongue histology and scanning electron microscopy of the diamondback water snake (Natrix rhombifera) and black rate snake (Elaphe obsoleta) (Reptilia, Serpentes, Colubridae)*. Journal of Herpetology, 12: 275–280.
- Murphy, J.C., M.J. Jowers, R.M. Lehtinen, S.P. Charles, G.R. Colli, A.K. Peres Jr., C.R. Hendry & R.A. Pyron. 2016. *Cryptic, Sympatric Diversity in Tegu Lizards of the Tupinambis teguixin Group (Squamata, Sauria, Teiidae) and the Description of Three New Species*. PLoS ONE, 11(8): e0158542.
- Nimer, E. 1989. *Climatologia do Brasil*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro.

- Nisa, C.R., M. Teixeira Jr. & M. T. Rodrigues. 2017. *Reproductive biology of three sympatric species of Gymnophthalmid lizards from the sand dunes of the Middle São Francisco River, Habia, Brazil*. South American Journal of Herpetology 12: 76–88.
- Nisa, C.R., G. Rodríguez-Ruiz, P. López, P.I. Silva Jr, M.T. Rodrigues & J. Martín. 2019. *Chemosensory discrimination of male age by female Psammodromus algirus lizards based on femoral secretions and feces*. Ethology, (2019): 1–8.
- Nordlund, D.A. & W.J. Lewis. 1976. *Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions*. Journal of Chemical Ecology, 2(2): 211–220.
- Nunes, P.M.S., A. Fouquet, F.F. Curcio, P.J.R. Kok & M.T. Rodrigues. 2012. *Cryptic species in Iphisa elegans Gray, 1851 (Squamata: Gymnophthalmidae) revealed by hemipenial morphology and molecular data*. Zoological Journal of the Linnean Society, 166: 361–376.
- Oliveira, E.F., M. Gehara, V.A. São-Pedro, X. Chen, E.A. Myers, F.T. Burbrink, D.O. Mesquita, A.A. Garda, G.R. Colli, M.T. Rodrigues, F.J. Arias, H. Zaher, R.M.L. Santos & G.C. Costa. 2015. *Speciation with gene flow in whiptail lizards from a Neotropical xeric biome*. Molecular Ecology, 24: 5957–5975.
- Pavel, A.B. & C.I. Vasile. 2012. *PyElph – a software tool for gel images analysis and phylogenetics*. BMC Bioinformatics, 13: 1–6.
- Pellegrino, K.C.M., M.T. Rodrigues, Y. Yonenaga-Yassuda & J.W. Sites. 2001. *A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family*. Biological Journal of the Linnean Society, 74: 315–338.
- Pianka, E.R. & Vitt, L.J. *Lizards: windows to the evolution of diversity*. Califórnia: University of California Press, 2003. 335 pp.
- Pincheira-Donoso, D., D.J. Hodgson & T. Tregenza. 2008. *Comparative evidence for Strong phylogenetic inertia in precloacal signaling glands in a species-rich lizard clade*. Evolutionary Ecology Research, 10: 11–28.
- Pough, H., R.M. Andrews, J.E. Cadle, M.L. Crump, A.H. Savitzky & K.D. Wells. *Herpetology* 3ª edição. New Jersey, Prentice Hall. 2003.
- Pyron, R.A., F.T. Burbrink & J.J. Wiens. 2013. *A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes*. BMC Evolutionary Biology, 13(93): 53 pp.

- Reeder, T.W., C.J. Cole & H.C. Dessauer. 2002. *Phylogenetic relationships of whiptail lizards of the genus Cnemidophorus (Squamata: Teiidae): A test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins*. American Museum Novitates, 3365: 1–64.
- Roberts, J.B. & H.B. Lillywhite. 1980. *Lipid barrier to water exchange in reptile epidermis*. Science, 207: 1077–1079.
- Rocha, C.F.D. 2008. *Body size, female reproduction and sexual dimorphism in the lizard Ameiva ameiva (Teiidae) in a restinga of southeastern Brazil*. Revista Brasileira de Zoologia, 25(2): 370–372.
- Rocha, C.F.D., H.G. Bergallo & D. Peccinini-Seale. 1997. *Evidence of an unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus Cnemidophorus (Teiidae), with description of a new species*. Herpetologica, 53(3): 374–382.
- Rodrigues, M.T. 1991. *Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. I. Introdução à área e descrição de um novo gênero de microteiídeos (Calyptommatus) com notas sobre sua ecologia, distribuição e especiação (Sauria, Teiidae)*. Papéis Avulsos de Zoologia, 37 (19): 285–320.
- Rodrigues, M.T., M. Dixó, D. Pavan & V.K. Verdade. 2002. *A new species of Leposoma (Squamata, Gymnophthalmidae) from the remnant Atlantic Forests of the state of Bahia, Brazil*. Papéis Avulsos de Zoologia, 42(14): 335–350.
- Rodrigues, M.T., M. Teixeira Jr., R.S. Recoder, F. Dal Vechio, R. Damasceno & K.C.M. Pellegrino. 2013. *A new species of Leposoma (Squamata: Gymnophthalmidae) with four fingers from the Atlantic Forest central corridor in Bahia, Brazil*. ZOOTAXA, 3635(4): 459–475.
- Sartorius, S., L.J. Vitt & G.R. Colli. 1999. *Use of naturally and anthropogenically disturbed habitats in Amazonian rainforest by the teiid lizard Ameiva ameiva*. Biological Conservation, 90: 91–101.
- Sazima, I. 2015. *Corpse bride irresistible: a dead female tegu lizard (Salvator merianae) courted by males for two days at an urban park in South-eastern Brazil*. Herpetology Notes, 8: 15–18.
- Schwenk, K. 1985. *Occurrence, distribution and functional significance of taste buds in lizards*. Copeia, 1985(1): 91–101.
- Shine, R., M.M. Olsson & R.T. Mason. 2000. *Chastity belts in gartersnakes: the functional significance of mating plugs*. Biological Journal of the Linnean Society, 70: 377–390.

- Shine, R., B. Phillips, H. Wayne, M. Lemaster & R.T. Mason. 2003. *Chemosensory cues allow courting male garter snakes to assess body length and body condition potential mates*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 54: 162–166.
- Silva, M.B. & T.C.S. Ávila-Pires. 2013. *The genus Cnemidophorus (Squamata: Teiidae) in state of Piauí, northeastern Brazil, with description of a new species*. Zootaxa, 3681 (4): 455–477.
- Simnandle, E.T., R.E. Espinoza, K.E. Nussear & C.R. Tracy. 2001. *Lizards, lipids, and dietary links to animal function*. Physiological and Biochemical Zoology, 74 (5): 625–640.
- Simon, J.C., F. Delmotte, C. Rispe & T. Crease. 2003. *Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals*. Biological Journal of the Linnean Society, 79: 151–163.
- Smith, R.E. 1968. *Experimental evidence for a gonadal-fat body relationship in two teiid lizards (Ameiva festiva, Ameiva quadrilineata)*. Biological Bulletin, 134 (2): 325–331.
- Suzuki, K., T. Shimizu & T. Nakata. 1998. *The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivatives suppress body weight gain, body fat accumulation and serum lipid concentration in mice*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 8(1998): 2133–2138.
- Symonds, M.R.E. & M.A. Elgar. 2008. *The evolution of pheromone diversity*. Trends in Ecology and Evolution, 23(4): 220–228.
- Tamilmani, E., R. Radhakrishnan & K. Sankaran. 2018. *13-Docosenamides release by bacteria in response to glucose during growth-fluorescein quenching and clinical application*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(15): 6673–6685.
- Touhara, K. 2008. *Sexual communication via peptide and protein pheromones*. Current Opinion in Pharmacology, 8: 759–764.
- Uetz, P., P. Freed & J. Hosek. 2019. *The Reptile Database*, <http://www.reptile-database.org>. Acessado em: 30 de maio de 2019
- Ugueto, G.N. & M.B. Harvey. 2011. *Revision of Ameiva ameiva Linnaeus (Squamata: Teiidae) in Venezuela: recognition of four species and status of introduced populations in Southern Florida, USA*. Herpetological Monographs, 25(1): 113–170.

- Valdecantos, S., V. Martínez & A. Labra. 2015. *Description of a proctodeal gland present in three South American Liolaemus lizards (Iguania: Liolaemidae)*. *Salamandra*, 51(2): 182–186.
- Vega Parry, H., T. Alonso, H. Caldironi & M.E. Manes. 2013. *Composition of neutral lipids and phospholipids in tegu lizard Tupinambis merianae fat bodies*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 33 (2): 129–137.
- Vitt, L.J. 1982. *Reproductive tactics of Ameiva ameiva (Lacertilia: Teiidae) in a seasonally fluctuating tropical habitat*. *Canadian Journal of Zoology*, 60: 3113–3120.
- Vitt, L.J. 1991. *Ecology and life history of the wide-foraging lizard Kentropyx calcarata (Teiidae) in Amazonian Brazil*. *Canadian Journal of Zoology*, 69(11): 2791–2799.
- Vitt, L.J. & G.R. Colli. 1994. *Geographical ecology of a Neotropical lizard: Ameiva ameiva (Teiidae) in Brazil*. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 1986–2008.
- Vitt, L.J. & T.C.S. Ávila-Pires. 1995. *Ecology of two sympatric species of Neusticurus (Sauria: Gymnophthalmidae) in the Western Amazon of Brazil*. *Copeia*, 1998(3): 570–582.
- Vitt, L.J., P.A. Zani, J.P. Caldwell & E.O. Carrillo. 1995. *Ecology of the lizard Kentropyx pelviceps (Sauria: Teiidae) in lowland rain forest of Ecuador*. *Canadian Journal of Zoology*, 73(4): 691–703.
- Vitt, L.J., P.A. Zani & A.C.M. Lima. 1997. *Heliotherms in tropical rain forest: the ecology of Kentropyx calcarata (Teiidae) and Mabuya nigropunctata (Scincidae) in the Curuá-Una of Brazil*. *Journal of Tropical Ecology*, 13(2): 199–220.
- Weldon, P.J. & D. Bagnall. 1987. *A survey of polar and nonpolar skin lipids from lizards by thin-layer chromatography*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 87(2): 345–349.
- Weldon, P.J., B.S. Dunn, C.A. McDaniel & D.I. Werner. 1990. *Lipids in the femoral gland secretions of the green iguana (Iguana iguana)*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 95: 541–543.
- Weldon, P.J., B. Flachsbarth & S. Schulz. 2008. *Natural products from the integument of nonavian reptiles*. *Natural Product Reports*, 25: 738–756.
- Werneck, F.D.P., L.G. Giugliano, R.G. Collevatti & G.R. Colli. 2009. *Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus Kentropyx (Squamata: Teiidae)*. *Molecular Ecology*, 18(2): 262–278.

- Wilgers, D.J. & E.A. Horne. 2009. *Discrimination of chemical stimuli in conspecific fecal pellets by visually adept iguanid lizard, Crotaphytus collaris*. Journal of Ethology, 27: 157–163.
- Wilson, K. & J. Walker. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7ª edição. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2010. 761 páginas.
- Wyat, T.D. 2010. *Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates*. Journal of Comparative Physiology A, 196: 685–700.
- Wyatt, T.D. *Pheromones and Animal Behavior: Chemical signals and signature mixtures*. 2ª edição. Cambridge, Cambridge University Press. 2014a.
- Wyatt, T.D. 2014b. *Proteins and peptides as chemicals signals and signature mixtures*. Animal Behaviour, 97: 273–280.
- Yanosky, A.A., D.E. Iriart & C. Mercolli. 1993. *Predatory behavior in Tupinambis teguixin (Sauria: Teiidae). I. Tongue-flicking responses to chemical food stimuli*. Journal of Chemical Ecology, 19(2): 291–299.
- Zar, J.H. *Biostatistical analysis*. 5ª edição. Nova Jersey: Pearson Prentice Hall, 2010. 944 páginas.
- Zozaya, S.M., M. Higgie, C. Moritz & C.J. Hoskin. 2019. *Are pheromones key to unlock cryptic lizard diversity?* The American Naturalist, 2019: 1–41.