Carolina Nisa Ramiro

**Biologia reprodutiva de três espécies
simpátricas de lagartos da família
Gymnophthalmidae na região das Dunas
do Rio São Francisco, BA**

São Paulo

2015

Carolina Nisa Ramiro

**Biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de lagartos
da família Gymnophthalmidae na região das Dunas do Rio
São Francisco, BA**

Reproductive biology of three sympatric species of lizards of
Gymnophthalmidae in the region of sand dunes of São Francisco river, BA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Zoologia, na Área de
Herpetologia.

Orientador: Miguel Trefaut Rodrigues

São Paulo

2015

Nisa, Carolina R.

Biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de lagartos da família Gymnophthalmidae na região das Dunas do Rio São Francisco, BA

144 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Ciclo reprodutivo 2. Comunicação química 3. Gymnophthalmidae I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues (orientador)

Ao meu pai que desejava ter uma filha cientista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo Auxílio à Pesquisa (Processo 2013/03318-1), ambos fundamentais para a realização deste projeto.

Agradeço ao prof. Miguel Trefaut Rodrigues pela orientação, pela confiança, por compartilhar comigo sua paixão pela herpetofauna e por me apresentar à Caatinga.

Agradeço à prof.^a Cláudia Furlan e à Aline Bertinatto Cruz pela paciência, pelo interesse e pelo conhecimento compartilhado, que tornaram possível a realização de parte da metodologia deste trabalho.

Agradeço aos professores, José Eduardo Amoroso Marian e Fernando Carbayo, e aos técnicos do Laboratório de Histologia, Phillip Lenktaitis e Ênio Mattos, pelo ensinamento das técnicas histológicas.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório pelas dicas, pelas discussões, pela amizade e pelas risadas. É um prazer poder trabalhar ao lado de pessoas como vocês.

Agradeço ao Mauro Teixeira Junior por me acompanhar nas viagens de campo, por sempre acreditar em mim, por ser um exemplo e por ter se tornado parte da minha família.

Agradeço aos meus amigos por todo o apoio que me deram ao longo da graduação e do mestrado. Bruna Batista, Bruna Oliveira, Mariana Edaes, Felipe Senço, Henrique Kurosaki, José Paulo Fellici, Lucila Barreiros, Maitê Leite e Maysa Miceno, obrigada por tornarem minha vida mais leve e mais feliz. Bruna Pimentel, Guilherme Garcia, Gustavo Burin e Marcel Urabayashi, obrigada por serem os “velhos” a quem eu sempre pude pedir socorro.

Agradeço ao Gilberto Bergamo Neto por ter permanecido ao meu lado, por quebrar cupinzeiros, por pegar baratas, por carregar terrários, por todo o carinho e por não se aborrecer com tanta conversa sobre calangos.

Agradeço as minhas tias, Eliana Myara e Elis Regina Nisa, ao meu tio Élio Myara e aos meus primos, Renato Myara e Arthur Nisa, por terem sempre torcido por mim e por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço à minha irmã, Pryscilla Nisa Ramiro, por ter me permitido o contato com lagartos há oito anos e por ser a minha primeira aluna e ao meu cunhado, Paulo Moratti, pela preocupação e pelos conselhos.

Agradeço à minha mãe, Elizabeth Aparecida Nisa, por tudo. Não há palavras que expressem tudo o que ela fez e faz por mim e nem o quanto isso foi essencial para que eu continuasse a perseguir meus objetivos.

Agradeço, especialmente, à Maria Auxiliadora Ribeiro (Dora) e ao Niltom Ribeiro (Doga) por me receberem tão bem, por serem pessoas tão incríveis e por toda a ajuda no trabalho em Alagoado.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução	10
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Área de estudo	15
3.2. Espécies estudadas	16
3.3. Trabalho de campo e amostragem	19

CAPÍTULO 1 – Biologia Reprodutiva de três espécies simpátricas de lagartos da família Gymnophthalmidae na região das Dunas do Rio São Francisco, BA

1. Introdução	22
2. Materiais e Métodos	28
2.1. Obtenção dos dados	28
2.2. Ciclo reprodutivo	29
2.3. Dimorfismo sexual	32
2.4. Condições ambientais	33
3. Resultados	34
3.1. Erro de medição	34
3.2. Anatomia do aparelho reprodutor	34
3.3. Condições ambientais	37
3.4. <i>Calyptommatus leiolepis</i>	42
3.5. <i>Nothobachia ablephara</i>	51

3.6. <i>Procellosaurinus tetradactylus</i>	59
4. Discussão	66
5. Conclusões	78

CAPÍTULO 2 – Caracterização dos compostos químicos presentes nos poros pré-anais e em secreções cloacais de *Nothobachia ablephara* e *Calyptommatus leiolepis*

1. Introdução	80
2. Materiais e Métodos	84
2.1. Obtenção das amostras	84
2.2. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas	88
2.3. Análises qualitativas e estatísticas	89
3. Resultados	91
3.1. Dificuldades metodológicas	91
3.2. Esfregaço cloacal	91
3.2.1. <i>Calyptommatus leiolepis</i>	92
3.2.2. <i>Nothobachia ablephara</i>	96
3.2.3. Comparações interespecíficas	99
3.3. Poros pré-cloacais	102
4. Discussão	104
5. Conclusões	109
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS	111

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
-----------------------------------	------------

Resumo	128
--------	-----

Abstract	129
----------	-----

APÊNDICES

Apêndice I	130
------------	-----

Apêndice II	131
-------------	-----

Apêndice III	134
--------------	-----

Apêndice IV	135
-------------	-----

Apêndice V	138
------------	-----

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução

Informações detalhadas sobre a história de vida como, por exemplo, a idade da maturidade sexual, sobrevivência, taxa de crescimento e modo reprodutivo (oviparidade x viviparidade), são fundamentais para a compreensão da evolução dos padrões ecológicos das espécies (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Braz *et al.*, 2014; Garda *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2014). Neste contexto, enquadram-se os trabalhos descritivos sobre padrões reprodutivos, essenciais não apenas para formular e testar diferentes hipóteses sobre padrões evolutivos (Balestrin *et al.*, 2010; Dias, 2012; Vitt, 1986), como para a definição de estratégias de conservação para espécies ameaçadas de extinção (Almeida-Santos *et al.*, 2014).

A estratégia reprodutiva é o conjunto de adaptações que promove a forma mais eficiente de uma população sobreviver sob condições particulares de um determinado ambiente (Ferreira *et al.*, 2011). Aspectos reprodutivos sofrem influências de condições ambientais (Fitch, 1970), da história filogenética do grupo (Garda *et al.*, 2012; Orofino, *et al.*, 2010; dos Santos, 2013) ou da somatória dos dois (Brown & Shine, 2006; Dunham & Miles, 1985; Ramos-Pallares *et al.*, 2010) e é necessário o acúmulo de informações de diferentes táxons e de diferentes localidades, para realizar comparações intra e interespecíficas, que auxiliam na definição de quais são os fatores de maior influência nos padrões reprodutivos de um dado grupo (Ferreira *et al.*, 2011).

A ordem Squamata é uma das linhagens mais diversas de vertebrados terrestres com mais de 9.500 espécies, que ocorrem em todos os continentes, com exceção da Antártica e apresentam ampla variedade de ecologias e padrões corporais (Diehl, 2007; Pianka & Vitt, 2003; Pough *et al.*, 2003; Pyron *et al.*, 2013; Veludo, 2011). Embora os Squamata sejam um excelente modelo para estudos ecológicos, os lagartos apresentam a vantagem de serem componentes conspicuos da fauna da qual fazem parte, tendo sua observação e coleta facilitada quando comparados com serpentes e anfisbênas (Andrade *et al.*, 2006; Cassel *et al.*, 2012; dos Santos, 2013), além de serem, em sua maioria, diurnos, de fácil manuseio e bem conhecidos taxonomicamente

(Montechiaro, 2008). Apenas 5% das espécies conhecidas de Squamata possuem informações detalhadas sobre sua história natural (Garda *et al.*, 2014) e mesmo com a facilidade prática que envolve os estudos com lagartos, ainda há pouquíssima informação sobre aspectos reprodutivos no que se refere aos gêneros e espécies tropicais (Balestrin *et al.*, 2010; Braz *et al.*, 2014; Cottone & Bauer, 2009; Diehl, 2007; Léon & Ruiz, 1971; Tsai & Tu, 2000).

A comunicação química é bastante utilizada entre os Squamata e em alguns táxons desempenha um papel essencial na reprodução, permitindo que os indivíduos de uma determinada espécie sejam capazes de se reconhecer e definir o status social e as condições físicas de seus coespecíficos (Alberts, 1990; Clark, 2007; Cooper & Pérez-Mellado, 2001; Martin & López, 2000). Esse tipo de comunicação é mediado, basicamente, por ferormônios que são produzidos por glândulas exócrinas e liberados no ambiente, e então transmitidos para a língua e órgão de Jacobson, enquanto o animal explora o ambiente (Escobar *et al.*, 2001; Pough *et al.*, 2003). Para lagartos o estudo da comunicação química é de extrema importância para compreender melhor a biologia e o comportamento das espécies (Alberts, 1990; Martin & López, 2000), principalmente para aquelas que dependem basicamente deste meio de comunicação, além de permitir a identificação de complexos de espécies de morfologia críptica, como foi demonstrado para lagartos da família Lacertidae (Gabirot *et al.*, 2012). Assim como os dados sobre padrões reprodutivos, os dados referentes à comunicação das espécies são de extrema importância para melhor compreensão da filogenia e ecologia, principalmente se forem feitos de maneira comparativa (Alberts, 1990).

A família Gymnophthalmidae é exclusivamente neotropical, reunindo aproximadamente 250 espécies (Uetz, 2015) de lagartos de pequeno a médio porte, com comprimento rostro-cloacal variando entre 4 e 15 cm, que têm sido informalmente tratados por microteiídeos (Pellegrino *et al.*, 2001). Apresentam grande variedade de habitats, ocorrendo de regiões tipicamente florestais até áreas abertas, e ampla diversidade morfológica, compreendendo desde espécies com corpo lacertiforme típico a outras com variado grau de redução dos membros e alongação do corpo (Siedschlag *et al.*, 2010). Até o começo dos anos 2000 considerava-se que as relações filogenéticas dos gimnophthalmídeos

estavam longe de serem bem compreendidas, não só pela raridade de alguns táxons em coleções, mas também pela presença de adaptações morfológicas convergentes (Pellegrino *et al.*, 2001), porém atualmente esta é uma das famílias cujas relações filogenéticas têm sido mais bem estudadas na América do Sul (Rodrigues & Santos, 2008; Siedschlag *et al.*, 2010).

Os microteídeos são bastante abundantes e diversos na região de dunas interiores no curso médio do Rio São Francisco, no noroeste do estado da Bahia (Rodrigues, 1991a; b e c), principalmente no que diz respeito às espécies pertencentes à tribo Gymnophthalmini, que apresentam corpo alongado, redução dos membros e são normalmente associados a ambientes arenosos e hábitos fossórios (Yonenaga-Yassuda *et al.*, 2005). A elevada semelhança morfológica encontrada entre alguns lagartos da tribo, como é o caso dos gêneros *Nothobachia*, *Calyptommatus* e *Scriptosaura*, todos serpentiformes e com acentuada redução dos membros (Rodrigues, 1984; Rodrigues, 1991a e Rodrigues & Santos, 2008), dá suporte a necessidade de estudos baseados em características alternativas, além da morfologia externa, combinados com os estudos moleculares que auxiliariam, não apenas a esclarecer as relações de parentesco entre os Gymnophthalmidae (Pellegrino *et al.*, 2001; Siedschlag *et al.*, 2010 e Yonenaga-Yassuda *et al.*, 2005), mas para melhor entender os mecanismos envolvidos na evolução do morfotipo serpentiforme dentro da família.

Embora os gimnoftalmíneos estejam sendo bem estudados do ponto de vista da morfologia externa, osteologia, desenvolvimento embrionário, citogenética e disponhamos de estudos filogenéticos e filogeográficos relativamente robustos, faltam informações básicas sobre a biologia das espécies (Nisa, 2012; Pellegrino *et al.*, 2001; Recoder, 2012; Roscito, 2010; Roscito & Rodrigues, 2010; Siedschlag *et al.*, 2010 e Yonenaga-Yassuda *et al.*, 2005). Para as espécies serpentiformes dispomos apenas de alguns dados sobre hábitos alimentares (Moraes, 1993; Rocha & Rodrigues, 2005 e Santos *et al.*, 2012), embora saibamos que a associação de estudos moleculares com informações autoecológicas mais refinadas é importante como recurso adicional para avaliar o status taxonômico de espécies com distribuição

relictual, permitindo uma melhor compreensão da sua história e da dinâmica de paisagens fragmentadas (Rodrigues, 2005).

As poucas informações sobre a reprodução de lagartos brasileiros da família Gymnophthalmidae concentram-se nas espécies de corpo lacertiforme (Balestrin *et al.*, 2010; Bernardo *et al.*, 2011; Dal Vechio, 2014; Jared *et al.*, 2009; Teixeira & Fonseca, 2003 e Teixeira Jr., 2010), em alguns casos apenas como notas. Em relação aos lagartos da família Gymnophthalmidae nada é conhecido acerca da composição e do significado funcional dos ferormônios produzidos, sendo este o provável mecanismo de comunicação mais importante entre as espécies fossoriais de corpo serpentiforme.

É neste contexto que se insere a necessidade de investigar com mais profundidade a biologia reprodutiva e a composição química de prováveis fontes de ferormônios dos Gymnophthalmidae fósseis, que ocorrem na região das dunas do Rio São Francisco, sujeita a modificações e danos causados por alterações no curso do rio com a construção de barragens e hidrelétricas (Rodrigues, 2005).

2. Objetivos

Descrever e comparar o ciclo reprodutivo de *Calyptommatus leiolepis*, *Nothobachia ablephara* e *Procellosaurinus tetradactylus* e procurar caracterizar os compostos químicos potencialmente envolvidos na comunicação intraespecífica de *C. leiolepis* e *N. ablephara*.

Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de dimorfismo sexual em tamanho e coloração para as três espécies, caracterizando e comparando o padrão encontrado em cada uma delas.
- Definir a razão sexual observada em juvenis e adultos, o período de cópula e de postura dos ovos, tamanho e idade da maturidade sexual, para cada sexo, em cada uma das espécies.
- Relacionar o ciclo reprodutivo de cada uma das espécies com as variações anuais de temperatura e precipitação.
- Analisar bioquimicamente os esfregaços cloacais e secreções de poros pré-anais de *C. leiolepis* e *N. ablephara* em busca de caracterizar as moléculas que possam agir como ferormônios.
- Realizar comparações intra e interespecíficas, qualitativas e quantitativas, quanto aos compostos químicos identificados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Área de estudo

Na altura do curso médio do rio São Francisco, no noroeste do estado da Bahia, dentro do domínio morfoclimático da Caatinga, há uma extensa área na qual se observam manchas de solos arenosos nas duas margens do rio e a formação de dois campos de dunas bastante distintos na margem esquerda (**Figura 1**). Essa área representa um importante ponto de endemismos da Caatinga, apresentando gêneros e espécies que são únicos para a região Neotropical com marcadas adaptações para a vida fossorial e semi-fossorial (Rodrigues, 2003).

Figura 1 – Região dos campos de dunas da margem esquerda do rio São Francisco.

O campo de dunas de Xique-Xique localiza-se ao norte da serra do Estreito e é o maior campo de dunas continentais do Brasil, com cerca de 120 km de extensão. Ao norte deste encontra-se o campo de dunas de Alagoado, muito menor em extensão. Os dois campos de dunas representam juntos cerca de 10% da área do domínio morfoclimático da Caatinga. O campo de dunas de Alagoado foi escolhido como área de estudo pela presença das três

espécies alvo deste trabalho (*Calyptommatius leiolepis*, *Nothobachia ablephara* e *Procellosaurinus tetradactylus*), pela facilidade de acesso, quando comparado ao campo de dunas de Xique-Xique e pela presença de um morador da região que há anos colabora com o laboratório nas coletas na região.

O campo de dunas de Alagoado é formado por areias quartzosas extremamente finas, cuja coloração varia de branco ao castanho-claro, o relevo é pouco ondulado e a hegemonia da paisagem é quebrada pela presença de inselbergs e serras quartzíticas que atingem níveis altitudinais superiores aos das dunas (Rodrigues, 1991a). O revestimento florístico é complexo e denso, com escassas áreas naturais desprovidas de vegetação, e permanece verde durante todo o ano, diferente do observado na Caatinga típica que o circunda (Rodrigues, 1991a; Rocha & Rodrigues, 2005).

As temperaturas são relativamente constantes durante todo o ano e são as mais altas registradas para o estado da Bahia (medial anual excede os 26.2 °C, não ultrapassando os 29 °C) e a precipitação anual é irregular (variando entre 400 mm e 800 mm) com uma típica estação seca entre os meses de abril e outubro (Nimer, 1979; Rodrigues, 1991a; Rocha & Rodrigues, 2005).

3.2. As espécies

As três espécies utilizadas neste estudo (*Calyptommatius leiolepis*, *Nothobachia ablephara* e *Procellosaurinus tetradactylus*) pertencem à família Gymnophthalmidae (microteiídeos), ocorrem em simpatria no campo de dunas de Alagoado e fazem parte da tribo Gymnophthalmini, reconhecida por adaptações morfológicas que envolvem o alongamento do corpo e redução de estruturas como, por exemplo, os membros e as pálpebras (Pellegrino *et al.*, 2001).

Calyptommatus leiolepis Rodrigues, 1991

Microteíídeo pequeno e serpentiforme muito comum, caracterizado pela ausência de ouvido externo e pelo olho totalmente coberto por uma escama ocular. Membros anteriores ausentes e posteriores reduzidos a apêndices estiliformes. Escamas dorsais são lisas nos adultos e levemente carenadas nos juvenis. Coloração uniforme de fundo castanho-claro com pequenas manchas escuras dispostas de modo irregular. Machos apresentam quatro poros pré-anais. Ocorre nos dois campos de dunas da margem esquerda do rio São Francisco (Xique-Xique e Alagoado) e em manchas de areia nas adjacências (**Figura 2**).

Figura 2 – Indivíduo adulto de *Calyptommatus leiolepis* coletado no campo de dunas de Alagoado em agosto de 2013 (Foto: Mauro Teixeira Junior).

Nothobachia ablephara Rodrigues, 1984

Microteíídeo de pequeno porte caracterizado pela ausência de pálpebra e de ouvido externo. Corpo alongado, membros anteriores reduzidos a apêndices estiliformes, os posteriores apresentam apenas dois dedos. Dorso com escamas carenadas e faces ventral e lateral com escamas lisas. Lados do corpo e da cauda, assim como os membros, com coloração castanho-escura. Machos apresentam seis poros pré-anais. Ocorre nos dois campos de dunas da margem esquerda do rio São Francisco (Xique-Xique e Alagoado) e em manchas de areia no estado do Piauí e Pernambuco. *N. ablephara* é a única espécie do gênero (**Figura 3**).

Figura 3 – Indivíduo adulto de *Nothobachia ablephara* coletado no campo de dunas de Alagoado em agosto de 2013 (Foto: Mauro Teixeira Junior).

Procellosaurinus tetradactylus Rodrigues, 1991

Microteídeo lacertiforme e pequeno caracterizado pela ausência de pálpebra e presença de ouvido externo. Membros anteriores com dedo interno ausente e membros posteriores pentadáctilos. Cauda mais longa do que o corpo e de coloração vermelha. As escamas são lisas e há uma faixa clara dorsolateral fortemente marginada por negro da escama prefrontal até a raiz do braço. Machos com poros femorais e pré-anais e fêmeas apenas com poros pré-anais. Ocorre apenas no campo de dunas de Alagoado no estado da Bahia (**Figura 4**).

Figura 4 – Indivíduo adulto de *Procellosaurinus tetradactylus* coletado no campo de dunas de Alagoado em agosto de 2013 (Foto: Mauro Teixeira Junior).

3.3. Trabalho de campo e amostragem

Foram realizadas quatro expedições ao campo de dunas de Alagoado, três durante a estação seca (15 a 25 de agosto de 2013, 26 de novembro a 7 de dezembro de 2013 e de 25 de agosto a 2 de setembro de 2014) e uma durante a estação chuvosa (15 a 24 de abril de 2014). Embora vários pontos tenham sido amostrados em cada viagem, os trabalhos concentraram-se em três locais nas proximidades do povoado de Alagoado (**Figura 5**):

Figura 5 – **A:** “primeiro roçado”; **B:** “segundo roçado”; **C:** área de afloramento rochoso nas proximidades do povoado de Alagoado; **D:** vista geral do campo de dunas de Alagoado, aproximadamente 5 km antes do povoado (Fotos: Carolina Nisa).

- Primeiro roçado: há trechos de areia totalmente descoberta e outros com arbustos, acúmulo de folhigo e de galhos quebrados. Ocorrem algumas árvores de maior porte.
- Segundo roçado: área bastante modificada pelas tentativas de cultivo. A cobertura vegetal é bastante escassa, a fonte de sombra limita-se a pequenos arbustos isolados e por uma extensa cerca construída com galhos. A

areia é de coloração bastante clara e o folhiço é formado por pequenos galhos e folhas maiores.

- Afloramento rochoso: um pequeno afloramento rochoso circundado por arbustos e árvores de maior porte. Nesta área há porções com areias de coloração mais escura e o folhiço é mais denso, formado por folhas muito pequenas.

Durante todas as manhãs foram realizadas buscas ativas em um ou mais pontos. Os locais eram escolhidos de acordo com a disponibilidade de proteção contra o Sol e pela presença de rastros na areia, que são característicos dos dois gêneros serpentiformes (**Figura 6**). Cada ponto foi cuidadosamente rastelado para verificar a presença dos lagartos. Os indivíduos coletados foram armazenados em sacos plásticos, anotadas a data e a coordenada geográfica. Além das amostras obtidas durante as quatro expedições, aproveitamos os exemplares mortos pelos habitantes locais no curso da manutenção de suas roças que conseguimos organizar em amostras mensais (de janeiro de 2013 a agosto de 2014). O **Apêndice I** apresenta os números de campo de cada indivíduo (**MTR**) e o **Apêndice II** o número de indivíduos coletados em cada um dos meses amostrados para cada uma das espécies.

Os exemplares coletados durante as viagens ao campo foram sacrificados com injeções letais de anestésicos e fixados em formol 10%. Aqueles coletados mensalmente pelos habitantes locais foram fixados em álcool 100%. Todos os indivíduos permanecem preservados em álcool 70% e encontram-se no Laboratório de Herpetologia, do Departamento de Zoologia, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e em breve serão encaminhados ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Vários indivíduos foram utilizados apenas para a obtenção de esfregaços cloacais e remoção dos poros pré-anais, sendo devolvidos para o ponto no qual haviam sido coletados.

Dados de temperatura do ar, do solo e de umidade do ar foram obtidos com o auxílio de dataloggers que permaneceram onde havia variação diária de

sombra e Sol, similar ao que ocorre diariamente nas áreas sob os arbustos amostrados.

Figura 6 – Rastro deixado por *Calyptommatus leiolepis* ou *Nothobachia ablephara* e utilizado como indicativo da presença de indivíduos (Foto: Mauro Teixeira Junior).

CAPÍTULO 1

Biologia Reprodutiva de três espécies simpátricas de lagartos da família Gymnophthalmidae na região das Dunas do Rio São Francisco, BA

1. Introdução

Em um contexto evolutivo, a reprodução é muito mais complexa do que a simples fertilização (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Pianka & Vitt, 2003), pois envolve uma série de eventos que apresentam riscos e custos para os organismos (Pough *et al.*, 2003; Vitt & Cadwell, 2009), sendo um evento essencial na continuidade das espécies. O estudo dos padrões reprodutivos envolve uma série de fatores conflitantes na história de vida do indivíduo como, por exemplo, a relação entre fecundidade e custo energético (Garda *et al.*, 2014) e entre fecundidade e locomoção (Pough *et al.*, 2003).

Os ciclos reprodutivos envolvem mudanças na morfologia, fisiologia e comportamento dos organismos, que ocorrem regularmente, são integradas entre si e que podem ser controladas por fatores intrínsecos (genética) e extrínsecos (como, por exemplo, temperatura, umidade, disponibilidade de recursos etc) (Janeiro-Cinquini, 2004). Essas alterações não apenas funcionam como caracteres qualitativos na análise dos padrões reprodutivos de diferentes organismos, como estão envolvidas no sentido de promover a maneira mais eficiente de uma população sobreviver sob determinadas características ambientais (Ferreira *et al.*, 2011; Tinkle *et al.*, 1969).

Conhecer as estratégias reprodutivas de diferentes espécies e populações, assim como suas variações, é de extrema importância para melhor compreender os padrões evolutivos entre as linhagens, podendo inclusive auxiliar na elucidação de relações de parentesco (Balestrin *et al.*, 2010; Braz *et al.*, 2014; Shine & Bonnet, 2009). A importância de informações acerca da

forma como uma espécie se reproduz ganha ainda maior destaque quando pensamos em organismos como os répteis, cuja época de acasalamento representa a época de maior interação social entre machos e fêmeas para a grande maioria das espécies, uma vez que seus hábitos são bastante solitários e os encontros são relativamente raros (Pough *et al.*, 2003).

Há diferentes formas de se compreender e classificar os ciclos reprodutivos em répteis, variando de acordo com quais aspectos de um ciclo reprodutivo são selecionados para tal. Uma das formas mais amplas de se categorizar as espécies envolve três grandes grupos que podem ser divididos em vários subgrupos (Pough *et al.*, 2003). Um grupo envolve espécies que apresentam uma ninhada por ano e maturação sexual tardia, o segundo grupo inclui as espécies que possuem múltiplas ninhadas por ciclo reprodutivo e maturação precoce e o último grupo inclui as espécies com múltiplas ninhadas e maturação tardia. Tinkle e colaboradores (1969) reconhecem apenas os dois primeiros grupos, revelando a variedade de maneiras sob as quais se pode compreender e analisar os ciclos reprodutivos de répteis.

Em Squamata padrões reprodutivos têm sido estudados principalmente em organismos de zona temperada, deixando uma lacuna no conhecimento das espécies neotropicais (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2014; Böhn *et al.*, 2013; Cottone & Bauer, 2009), que começaram a receber maior atenção nos últimos vinte anos (Mathies, 2011; Vitt, 1986). Estes últimos ainda são bastante escassos, principalmente no que diz respeito a determinados grupos e comportamentos de cópula (Jared *et al.*, 2009; Léon & Ruiz, 1971). A maioria dos estudos reprodutivos de espécies tropicais tem sido realizada com base em exemplares de coleções, muitas vezes com poucos indivíduos e sem continuidade temporal entre as amostras (Pizzato & Marques, 2007; Mathies, 2011), além de se concentrarem em algumas poucas famílias: Polychrotidae, Scincidae, Tropiduridae e Gekkonidae (Montechiaro, 2008). Mesmo que os estudos reprodutivos em Squamata não abranjam uma parcela considerável da diversidade existente, há registro de uma variedade tão ampla de estratégias reprodutivas que não há como enquadrar toda a diversidade encontrada em espécies neotropicais em uma única categoria (Cruz, 1994; Diehl, 2007; Léon & Ruiz, 1971; Pizzato & Marques, 2007; Tinkle *et al.*, 1969).

Historicamente, o padrão de atividade reprodutiva em Squamata tem sido associado com fatores ambientais limitantes, sendo o fotoperíodo e a temperatura os mais importantes na definição do ciclo reprodutivo de espécies de zonas temperadas (Ferreira *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011). A influência destes fatores pode ser testada através da investigação das estratégias reprodutivas de espécies de ampla distribuição que apresentem populações em habitats sujeitos a condições ambientais distintas (Ferreira *et al.*, 2011; Garda *et al.*, 2012). Com base no conhecimento sobre espécies de zona temperada e das condições climáticas em zonas tropicais, foram propostas duas hipóteses para a influência de condições ambientais para os lagartos tropicais (Brown & Shine, 2006; Carvalho, 1992): (1) reprodução contínua em ambientes nos quais as chuvas são relativamente constantes e (2) reprodução sazonal em locais nos quais as chuvas são periódicas. Embora alguns dados corroborem este modelo, há muitos outros que indicam uma maior diversidade, não apenas de padrões, mas de fatores ambientais e não ambientais envolvidos na determinação dos ciclos reprodutivos em espécies tropicais (Brown & Shine, 2006; Cruz, 1994; Ferreira *et al.*, 2009; León & Ruiz, 1971). Apenas um grupo de espécies de uma mesma localidade da Caatinga apresentou a quase totalidade de padrões reprodutivos já descritos para répteis (Vitt, 1992).

Com o avanço dos estudos sobre o tema, novos fatores passaram a receber atenção, além das condições ambientais básicas (temperatura, fotoperíodo e umidade). Fatores ecológicos (como, por exemplo, a disponibilidade de recursos), o modo reprodutivo (viviparidade *versus* oviparidade) e as relações filogenéticas (Pizzato & Marques, 2007) passaram a ser investigados. A disponibilidade de alimento e o modo de forrageio podem também estar relacionados com a capacidade de sobrevivência dos neonatos, influenciando a época do ano na qual a reprodução ocorre, permitindo assim que neonatos tenham maior chance de sobrevivência (Dias, 2012; Pianka & Vitt, 2003). Há ainda trabalhos relacionados à herpetofauna neotropical que indicam uma supervalorização das condições ambientais, revelando que para alguns casos a filogenia pode ser um fator de influência mais forte do que os índices de umidade ou temperatura (Garda *et al.*, 2012; Orofino *et al.*, 2010; Pizzatto & Marques, 2007; Ramos-Pallares *et al.*, 2010; Shine, 1986).

Os lagartos possuem um órgão copulador (hemipênis) e uma ampla diversidade de estratégias reprodutivas (Pianka & Vitt, 2003), mas em sua grande maioria são ovíparos, apresentando ovos com grande quantidade de vitelo, sendo que o tamanho da fêmea costuma desempenhar um importante papel no tamanho da postura e/ou no tamanho dos neonatos (Balestrin *et al.*, 2010; Teixeira & Fonseca, 2003). Os diferentes aspectos da biologia reprodutiva de lagartos, como a ocorrência de dimorfismo sexual, com fêmeas maiores que machos, é um possível indicativo de investimento energético distinto entre os dois sexos (Balestrin *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012).

Fitch (1970), em seu amplo trabalho sobre o ciclo reprodutivo de lagartos e serpentes, estipula os parâmetros que devem ser investigados para uma ampla compreensão dos aspectos reprodutivos de uma espécie: (1) a ocorrência de viviparidade ou oviparidade; (2) épocas de cópula, ovulação, oviposição e nascimento e suas correlações com as condições ambientais; (3) o número de ninhadas produzidas por estação reprodutiva; (4) duração do período de gestação e incubação; (5) tempo necessário entre o nascimento e o alcance da maturidade sexual; (6) número de ovos/indivíduos produzidos por ninhada e (7) comparações intraespecíficas dos parâmetros acima.

De maneira generalizada, os trabalhos sobre biologia reprodutiva de lagartos têm se preocupado em determinar quando ocorrem os períodos de cópula, de postura e de nascimentos para as espécies e qual é a correlação destes aspectos com as condições ambientais do meio (Brown & Shine, 2006; Capula & Luiselli, 1993; Cruz, 1994; Dal Vechio *et al.*, 2014; Dias, 2012; Diehl, 2007; Rocha, 2008), poucos sendo os trabalhos realizados na comparação de espécies simpátricas ou de diferentes populações de uma mesma espécie (Balestrin *et al.*, 2010; Carvalho, 1992; Ferreira *et al.*, 2011; Garda *et al.*, 2012; Shine, 1986; Souza & Rosso, 2010; Vitt, 1986). Ainda mais raro são os trabalhos envolvendo espécies fossoriais, independente do tipo de habitat no qual ocorram (Montechiaro, 2008; Patchell & Shine, 1986). Patchell & Shine em 1986, ao trabalharem com a biologia reprodutiva de lagartos da família Pygopodidae, comentam sobre a ausência de dados sobre a biologia reprodutiva dos lagartos fossoriais com membros reduzidos e a importância dessas informações para compreender melhor as forças seletivas envolvidas

na evolução deste morfotipo. Um estudo realizado com lagartos da família Scincidae (Heideman *et al.*, 2011) revela a relação existente entre hábito fossório e especiação morfológica críptica e sua influência em outros aspectos de vida desses lagartos.

Embora a família Gymnophthalmidae compreenda uma ampla diversidade morfológica e de habitats, pouco se sabe a respeito dos aspectos ecológicos de suas espécies (Balestrin *et al.*, 2010; Carvalho, 1992; Jared *et al.*, 2009; Ramos-Pallares *et al.*, 2010). Os estudos realizados com a família têm se preocupado em descrever a diversidade, esclarecer as relações de parentesco entre as espécies e compreender os padrões de distribuição e variação geográfica, principalmente no que diz respeito aos gêneros da tribo Gymnophthalmini, cuja diversidade passou a ser mais bem conhecida na década de 90 com a descoberta dos gêneros e espécies associados aos solos arenosos na região do curso médio do Rio São Francisco (Nisa, 2012; Pellegrino *et al.*, 2001; Recoder, 2012; Roscito, 2010; Roscito & Rodrigues, 2010; Siedschlag *et al.*, 2010 e Yonenaga-Yassuda *et al.*, 2005). Em termos ecológicos, há alguns dados sobre dieta de microteiídeos (Moraes, 1993; Rocha & Rodrigues, 2005 ; Santos *et al.*, 2012) e sobre reprodução, que se concentram nas espécies de corpo lacertiforme (Balestrin *et al.*, 2010; Carvalho, 1992; Cruz, 1994; Dal Vechio *et al.*, 2014; Garda *et al.*, 2014; Gogliath *et al.*, 2010; Goldberg, 2009; Ramos-Pallares *et al.*, 2010; Roberto & Albano, 2012; Vieira *et al.*, 2000; Vitt, 1982), sendo basicamente ausente os dados ecológicos e reprodutivos para as espécies brasileiras de Gymnophthalmidae serpentiformes (Jared *et al.*, 2009; Moraes, 1993; Rocha & Rodrigues, 2005).

Para a grande maioria das espécies de Gymnophthalmidae o conhecimento acerca dos aspectos reprodutivos é bastante generalizado. Sabe-se que a maioria dos gimnoftalmídeos tem ampla estação reprodutiva, são ovíparos com ninhada fixa em dois ovos (eventualmente um ou três), que dimorfismo sexual em tamanho, forma e coloração é observado em alguns gêneros, mas ausente ou restrito em espécies subterrâneas, que no geral não são territorialistas e há ocorrência de partenogênese (Balestrin *et al.*, 2010; Carvalho, 1992; Diehl, 2007; Pianka & Vitt, 2003; Roberto & Albano, 2012). Há

notas reprodutivas do comportamento de cópula de *Alexandresaurus camacan* (Jared *et al.*, 2009) e *Micrablepharus maximiliani* (Gogliath *et al.*, 2010), sobre tamanho mínimo da maturidade sexual em *M. atticolus* (Vieira *et al.*, 2000) e *Pholidobolus montium* (Goldberg, 2009) e sobre tamanho da ninhada e oviposição em *Leposoma baturitensis* (Roberto & Albano, 2012). Informações mais robustas são observadas para *Dryadosaura nordestina* (Garda *et al.*, 2014), *M. maximiliani* (Dal Vechio *et al.*, 2014), *Cercosaura schreibersii* (Balestrin *et al.*, 2010; Diehl, 2007), *Gymnophthalmus leucomystax* e *G. underwoodi* (Carvalho, 1992), *Vanzosaura multiscutata* (como *Gymnophthalmus multiscutatus*, Vitt, 1982), *V. rubricauda* (Carvalho, 1994) e *Ptychoglossus bicolor* (Ramos-Pallares *et al.*, 2010).

É neste contexto que se insere a necessidade de investigar com mais profundidade a biologia reprodutiva dos Gymnophthalmidae fossórios, que ocorrem na região das dunas do Rio São Francisco, sujeita a modificações e danos causados por alterações no curso do rio com a construção de barragens e hidrelétricas (Rodrigues, 2005). *Calyptommatus leiolepis*, *Nothobachia ablephara* e *Procellosaurinus tetradactylus* são três espécies simpátricas da tribo Gymnophthalmini, endêmicas desta região (Siedschlag *et al.*, 2010), mas que pouco se sabe acerca de sua ecologia, principalmente no que diz respeito à reprodução (Moraes, 1993; Rocha & Rodrigues; 2005 e Santos *et al.*, 2012). O estudo de sua biologia reprodutiva é importante como contribuição ao conhecimento de suas histórias de vida e das forças seletivas atuando sobre as espécies de corpo serpentiforme da Caatinga brasileira. A melhor compreensão da biologia dessas espécies é de extrema importância para o desenvolvimento de planos de preservação, uma vez que se enquadram na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção e encontram-se em uma área sujeita à tão forte ação antropológica.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos dados

Foram analisados 388 indivíduos de *C. leiolepis*, 180 de *N. ablephara* e 47 de *P. tetradactylus* coletados mensalmente entre janeiro de 2013 e agosto de 2014, com exceção dos meses de abril de 2013 e março de 2014. Os exemplares encontram-se no Laboratório de Herpetologia, do Departamento de Zoologia, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e em breve serão encaminhados ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Foram tomadas cinco medidas morfométricas com paquímetro digital (precisão de 0,1mm): comprimento rostro-cloacal (**CRC**), da extremidade do focinho até a margem posterior da placa anal, comprimento da cauda (**CC**), da extremidade posterior da placa anal até a extremidade da cauda, altura da cabeça (**ACA**), medida perpendicular ao eixo do corpo no ponto mais alto da cabeça, largura da cabeça (**LCA**), medida transversal ao eixo do corpo no ponto mais largo da cabeça e comprimento da cabeça (**CCA**), da extremidade do focinho até o encontro das infra com as supralabiais. A condição da cauda também foi verificada, sendo classificadas como íntegras, quebradas ou regeneradas e apenas o primeiro tipo foi incluído nas análises estatísticas.

Incisões ventrais foram realizadas em todos os indivíduos para confirmação do sexo, observação do estado de maturação das gônadas e da ocorrência de corpos adiposos. Nos machos, os dois testículos foram medidos em seu maior e menor comprimento. Nas fêmeas, foram tomadas as medidas de maior e menor comprimento dos folículos em vitelogênese secundária, identificados por seu formato esférico ou elipsoide e coloração amarelada (Almeida-Santos & Orsi, 2002) e dos ovos oviduciais, além de realizada a contagem dos folículos não vitelogênicos e vitelogênicos em cada ovário e dos ovos em cada oviduto. Corpos adiposos foram classificados de acordo com a sua quantidade: ausente, pouco (limitando-se a dois filetes látero-ventrais), médio e muito (cobrindo ventralmente as estruturas do terço caudal da cavidade abdominal).

Previamente às análises, os dados morfométricos foram transformados em seu logaritmo decimal e realizado um boxplot para identificação de *outliers*. *Outliers* quando identificados, foram reanalisados, corrigindo assim possíveis erros de medição. A normalidade e a equivalência de variância dos dados foram testadas com base nos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente (Zar, 2010).

A porcentagem de erro de medição pode ser definida como a variabilidade de medições repetidas tomadas de um mesmo caracter em um mesmo exemplar e foi calculada pela fórmula indicada por Bailey & Byrnes (1990):

$$\%EM = \frac{S_w^2}{S_w^2 + S_a^2},$$

sendo o S_w^2 um componente de variância dentro do grupo, e de mesmo valor que o quadrado médio dentro dos grupos (MS_w) estimado pela ANOVA e o S_a^2 , corresponde à um componente de variância entre os grupos e é dado pela expressão:

$$\frac{MS_a - MS_w}{n^\circ \text{ de réplicas}}.$$

2.2. Ciclo reprodutivo

Maturidade sexual

Fêmeas foram consideradas sexualmente maduras pela presença de folículos vitelogênicos, ovos oviduciais e/ou corpos lúteos. A condição do oviduto também foi observada, uma vez que certos autores também a utilizam como indicativo de maturidade sexual (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2014; Braz *et al.*, 2014; Carvalho, 1992). Para os machos a maturidade foi inicialmente definida pela presença de ductos deferentes opacos (brancos) e enovelados e/ou por testículos hipertrofiados. Pela dificuldade de se definir com clareza o estado de maturação dos testículos através de sua morfologia (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Ramos-Pallares *et al.*, 2010), foram realizados

cortes histológicos do testículo esquerdo dos indivíduos de *C. leiolepis* e *N. ablephara* que apresentaram **CRC** entre 35 mm e 45 mm. A escolha de tal classe de tamanho foi baseada em dados de maturidade sexual observados por Moraes (1993) para *C. leiolepis*. A presença de espermatozoides confirmou o estado de maturação dos machos (Anjos & Rocha, 2008). Os testículos foram incluídos em historresina e corados com Azul de Toluidina (Cassel *et al.*, 2012), seguindo o protocolo apresentado no **Apêndice III**.

A idade com que os indivíduos atingem a maturidade sexual foi estimada, quando possível, a partir da correlação entre as épocas em que ocorrem os nascimentos, o tamanho dos recém-nascidos, a distribuição das classes de tamanho ao longo do período de estudo e o tamanho de maturação, para cada sexo.

Razão sexual

A razão sexual foi calculada separadamente para juvenis e adultos, possibilitando a identificação de uma possível taxa de sobrevivência diferencial entre machos e fêmeas de cada uma das espécies.

$$\text{Razão sexual} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ fêmeas}}{\text{n}^{\circ} \text{ machos}}$$

O teste Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar se as razões sexuais observadas para cada espécie e para cada fase de maturidade (juvenis e adultos) diferiam da esperada de 1:1.

Reprodução

Para as fêmeas, foram realizados gráficos de dispersão dos comprimento dos folículos vitelogênicos e dos ovos, tendo na abscissa os meses de coleta, assim como gráficos de dispersão do estado de maturidade (sub-adultas, adultas com folículos não vitelogênicos, adultas com folículos vitelogênicos e ovos) associado ao **CRC** e aos meses de coleta. Estes gráficos

foram utilizados para estimar a época e duração das fases de crescimento folicular, ovulação e cópula. Gráficos com a porcentagem de fêmeas reprodutivas em cada um dos meses foi utilizado para detectar quais os possíveis meses de pico reprodutivo, seja de cópula ou de postura (Capula & Luiselli, 1993; Zanchi-Silva *et al.*, 2013).

O volume de cada testículo foi estimado através da forma elipsoide (Balestrin *et al.*, 2010):

$$V = \frac{4 \left(\frac{1}{2} \text{ comprimento} \right) \times \left(\frac{1}{2} \text{ largura} \right)^2}{3}$$

Para estimar a fase de maior atividade testicular foram realizados gráficos de dispersão da soma dos volumes testiculares (volume testicular total) pelos meses do ano, indivíduos com um dos testículos danificados foram excluídos da amostra. Para testar se há variação entre o volume testicular total de adultos e sub-adultos ou entre os volumes dos testículos esquerdo e direito, independente do estado de maturação, foi utilizada a análise univariada de variâncias (ANOVA), quando respeitadas às premissas de normalidade e equivalência de variâncias, quando não, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para avaliar se há diferenças mensais entre o volume testicular total de machos adultos foi utilizado ANOVA ou o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando observadas diferenças, foi utilizado o teste post-hoc de Tukey para identificar quais eram os meses que divergiam dos demais (Zar, 2010). A correlação entre o tamanho dos machos e do volume testicular total foi testada separadamente para juvenis e adultos através da regressão linear do volume testicular tendo o **CRC** dos machos como variável independente.

O período de postura foi estimado através da ocorrência de corpos lúteos em fêmeas não grávidas ou pela observação de ovos nos ovidutos ou no substrato durante os trabalhos de campo. A duração do período reprodutivo foi estimada como o número de meses entre o primeiro mês no qual se observam folículos em vitelogênese secundária e o mês mais tardio no qual ocorre postura de ovos (Cox *et al.*, 2003). As fêmeas não vitelogênicas, mas que apresentaram ovidutos bastante opacos e pregueados foram consideradas como evidência de desova recente (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Alves *et al.*,

2014; Braz *et al.*, 2014; Carvalho, 1992). A presença simultânea de folículos em vitelogênese secundária e ovos oviduciais e/ou corpos lúteos foi considerada como evidência de múltiplas desovas.

A fecundidade de cada espécie foi estimada através da contagem dos folículos em vitelogênese secundária ou ovos oviduciais. A correlação entre o tamanho das fêmeas e o tamanho dos ovos foi testada através da regressão linear do comprimento dos ovos tendo o **CRC** das fêmeas como variável independente. Para testar se há variação entre o comprimento dos folículos vitelogênicos ou de ovos oviduciais esquerdo e direito, foi utilizada a análise univariada de variâncias (ANOVA), quando respeitadas às premissas de normalidade e equivalência de variâncias, quando não, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

2.3. Dimorfismo sexual

A ocorrência de dimorfismo sexual foi testada em relação ao tamanho absoluto e ao tamanho relativo apenas nos indivíduos sexualmente maduros. Para a análise do dimorfismo sexual em tamanho absoluto, foram comparados os logaritmos decimais das medidas de comprimento rostro-cloacal (**CRC**), comprimento da cauda (**CC**) e comprimento (**CCA**), largura (**LCA**) e altura (**ACA**) da cabeça, através da análise univariada de variâncias (ANOVA), quando respeitadas às premissas de normalidade e equivalência de variâncias, quando não, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Feltrim, 2002; Zar, 2010).

O grau de dimorfismo sexual em tamanho foi calculado pela fórmula (Shine, 1994):

$$SSD = \frac{\text{média CRC maior sexo}}{\text{média CRC menor sexo}} - 1$$

O grau de dimorfismo sexual é arbitrariamente definido como positivo para os casos nos quais as fêmeas são maiores que os machos e negativo para os casos nos quais machos representam o sexo de maior comprimento rostro-cloacal.

Para a análise do dimorfismo sexual no tamanho relativo (ou forma de acordo com Jolicoeur & Mosimann, 1960) da cabeça foram comparados os resíduos obtidos na análise de regressão linear do comprimento (**CCA**), altura (**ACA**) e largura (**LCA**) da cabeça, tendo o comprimento rostro-cloacal (**CRC**) como variável independente. Quando respeitadas às premissas de normalidade e equivalência de variâncias, a comparação foi feita através da ANOVA, quando não, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Feltrim, 2002; Zar, 2010).

2.4. Condições ambientais

Os dados de temperatura e umidade relativa do ar foram obtidos de duas maneiras distintas: através de dataloggers posicionados em um ponto próximo ao primeiro roçado em Alagoado e pelas medidas oficiais para a cidade de Remanso (cidade vizinha à Casa Nova) obtidas do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP). A temperatura da camada sub-superficial do solo também foi obtida através do posicionamento dos dataloggers em Alagoado.

As médias dos valores obtidos pelo BDMEP foram comparadas entre os anos de 2013 e 2014 utilizando a análise univariada de variâncias (ANOVA), quando respeitadas às premissas de normalidade e equivalência de variâncias, quando não, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A comparação entre os dados obtidos pelos dataloggers e os dados do BDMEP foi realizada seguindo a mesma metodologia. Tais comparações foram realizadas para validar o agrupamento dos dados obtidos dos meses, independente do ano.

A variação mensal dos valores de temperatura e umidade do ar, assim como a temperatura da camada sub-superficial do solo, foi testada utilizando-se todas as medidas obtidas ao longo dos meses de coleta. Para tal foi utilizada a análise univariada de variâncias (ANOVA), quando respeitadas às premissas de normalidade e equivalência de variâncias, quando não, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Quando detectada diferenças mensais nas medidas, foi realizado o teste post-hoc de Tukey para avaliar os meses par a par.

3. Resultados

3.1. Erro de medição

A **tabela 1** sumariza a porcentagem de erro de medição para cada um dos caracteres morfométricos para cada uma das espécies. %EM superiores a 5% ocorreram apenas em medidas de *P. tetradactylus*, para as outras duas espécies as %EM são pouco significativas.

Tabela 1 – Medidas da porcentagem de erro de medição para os cinco caracteres morfométricos analisados nas três espécies.

	CCA	ACA	LCA	CRC	CC
<i>Calyptommatus leiolepis</i>	3%	12%	1,60%	4,80%	0,50%
<i>Nothobachia ablephara</i>	4,50%	3,90%	4%	1,70%	0,50%
<i>Procellosaurinus tetradactylus</i>	6%	8,50%	2,80%	11%	0,25%

3.2. Anatomia do aparelho reprodutor

A anatomia geral do sistema reprodutor, tanto feminino quanto masculino, é similar nas três espécies, apresentando pouquíssima variação.

Fêmeas

Os ovários são órgãos fusiformes, de parede translúcida, pela qual é possível a observação dos folículos em seu interior. O tamanho dos ovários depende do tipo e da quantidade de folículos que possuem. São laterais ao tubo digestivo, posicionando-se dorsalmente no início do terço caudal da cavidade abdominal e o ovário direito é cranial ao esquerdo. Os ovidutos têm início sutilmente cranial aos ovários e estendem-se lateralmente na cavidade abdominal até a região da cloaca. A aparência dos ovidutos depende do seu estado de maturação, podendo variar de translúcidos a opacos, de lisos a

bastante pregueados (**Figura 7**). Variações devido ao estado de maturidade ou reprodutivo encontram-se ilustradas no **Apêndice IV**.

Figura 7 – Anatomia geral do aparelho reprodutor feminino de (A) *Calyptommatus leiolepis*, (B) *Nothobachia ablephara* e (C) *Procellosaurinus tetradactylus*. Para facilitar a observação das estruturas, o aparelho digestivo foi deslocado. Extremidade das setas pretas, ovidutos, extremidade das setas vermelhas, ovários e asterisco, corpos adiposos.

Machos

Os testículos são órgãos ovalados e, quando frescos, pode-se observar com clareza as enovelações em seu interior, porém após a fixação as enovelações tornam-se mais sutis. São laterais ao tubo digestivo, posicionando-se dorsalmente no início do terço caudal da cavidade abdominal e o testículo direito é cranial ao esquerdo e pareado com a adrenal direita. Os ductos

partem da porção mais cranial do testículo e podem ser translúcidos ou opacos, lisos ou enovelados. Nos indivíduos fixados, dificilmente consegue-se observar os epidídimos macroscopicamente (**Figura 8**).

Figura 8 – Anatomia geral do aparelho reprodutor masculino de (A) *Calyptommatus leiolepis*, (B) *Nothobachia ablephara* e (C) *Procellosaurinus tetradactylus*. Para facilitar a observação das estruturas, o aparelho digestivo foi deslocado. Extremidade das setas pretas, ductos deferentes, extremidade das setas vermelhas, testículos e asterisco, corpos adiposos.

3.3. Condições ambientais

A **Tabela 2** apresenta os dados de temperatura mínima, média e máxima e umidade relativa do ar, obtidas através dos dataloggers que permaneceram posicionados em Alagoado. A **Tabela 3** apresenta os mesmos dados, porém da localidade de Remanso, localizada a aproximadamente 50 km de Alagoado, obtidos do arquivo do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP).

Tabela 2 – Dados meteorológicos de temperatura mínima, média e máxima e umidade relativa do ar obtidas de *dataloggers* posicionados em Alagoado entre agosto de 2013 e agosto de 2014. Todas as temperaturas estão em °C e a umidade relativa do ar em porcentagem.

		<i>temp. máx.</i>	<i>temp. média</i>	<i>temp. mín.</i>	<i>umidade relativa</i>
2013	agosto	35,3	26,2	19,1	52,26
	setembro	39,5	27,77	18,6	46,45
	outubro	45,6	32,07	25,1	44,67
	novembro	36,5	29,88	24	51,93
	dezembro	34,2	28,44	24,8	73,33
2014	janeiro	35,4	28,05	20,9	51,33
	fevereiro	36,6	28,06	19,8	56,17
	março	36,6	28,38	21,3	57,83
	abril	36,3	27,37	20,5	64,96
	maio	35	26,44	19	61,72
	junho	35,2	26,11	18,2	57,76
	julho	35,2	25,61	17,9	57,41
	agosto	34,4	25,32	17,3	54,86

Os dados de 2013 e 2014 foram comparados utilizando os dados obtidos entre os meses de janeiro e agosto de cada ano na localidade de Remanso. Não foram observadas diferenças significativas nem entre as temperaturas médias do ar (ANOVA, $p = 0,12$ e $F = 2,74$), nem em relação à umidade relativa do ar (ANOVA, $p = 0,13$ e $F = 3,27$), sendo assim, para as análises de ciclo reprodutivo, os meses foram agrupados independentemente do seu ano de captura.

Os dados obtidos pelos dataloggers de Alagoado foram comparados com os dados obtidos da cidade de Remanso, não sendo observadas diferenças entre as temperaturas médias do ar (ANOVA, $p = 0,37$ e $F = 0,86$) (**Figura 9**), mas foram observadas entre as umidades relativas do ar (ANOVA, $p = 0,02$ e $F = 6,53$), sendo em média a umidade em Remanso maior que a de Alagoado (**Figura 10**).

Tabela 3 – Dados meteorológicos de temperatura mínima, média e máxima e umidade relativa do ar obtidas para a cidade de Remanso do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) entre janeiro de 2013 e agosto de 2014. Todas as temperaturas estão em °C e a umidade relativa do ar em porcentagem.

		<i>temp. máx.</i>	<i>temp. média</i>	<i>temp. mín.</i>	<i>umidade relativa</i>
2013	janeiro	32,95	27,82	23,95	65,12
	fevereiro	35,10	29,06	24,57	55,36
	março	34,53	28,95	24,42	58,68
	abril	32,54	27,57	23,59	63,8
	maio	32,21	27,13	23,36	61,12
	junho	31,72	26,64	22,47	59,29
	julho	31,48	25,73	21,26	58,55
	agosto	31,86	25,88	21,10	57,95
	setembro	33,60	27,08	22,18	55,15
	outubro	34,61	28,30	23,50	51,29
	novembro	33,30	27,74	23,40	57,3
	dezembro	30,18	25,96	22,27	74,66
2014	janeiro	32,46	27,56	23,35	60,90
	fevereiro	32,10	27,46	23,60	64,57
	março	32,12	27,42	23,61	67,5
	abril	30,51	26,55	22,61	70,68
	maio	30,27	26,31	22,49	64,62
	junho	30,49	25,50	21,48	61,19
	julho	29,90	25,11	21,18	60,78
	agosto	30,76	25,27	20,75	57,13

Figura 9 – Valores mensais das temperaturas médias do ar (°C). Barras cheias, dados obtidos através dos dataloggers posicionados no povoado de Alagoado; barras pontilhadas, dados para a cidade de Remanso do (BDMEP).

Figura 10 – Valores mensais da umidade relativa do ar (%). Barras cheias, dados obtidos através dos dataloggers posicionados no povoado de Alagoado; barras pontilhadas, dados para a cidade de Remanso do (BDMEP).

Há diferenças mensais significativas, tanto entre as medidas de temperatura do ar (Kruskal-Wallis, $p = 0$) (**Figura 11**), quanto entre a umidade relativa do ar (Kruskal-Wallis, $p = 0$). O mês de dezembro (73,3%) foi o mais úmido, seguido pelos meses de abril (64,96%) e maio (61,72%). O mês mais seco foi o de outubro (44,67%), seguido pelo mês de setembro (46,45%). Outubro foi o mês mais quente (temperatura média = 32,07 °C), seguido pelo mês de novembro (temperatura média = 29,88 °C). Não foram observadas diferenças entre as temperaturas dos meses de maio e junho e entre julho e agosto (Tukey's Test, $p > 0,09$), sendo os meses mais frios do ano (temperatura média < 27,77 °C).

Os equipamentos posicionados em Alagoado entre agosto e dezembro de 2013 para obtenção de dados sobre a temperatura da camada sub-superficial do solo apresentaram problemas, sendo assim só há dados para a temperatura do solo entre dezembro de 2013 e agosto de 2014 (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Dados meteorológicos de temperatura mínima, média e máxima da camada sub-superficial do solo em um ponto no povoado de Alagoado. Todas as temperaturas estão em °C.

		<i>temp. máx.</i>	<i>temp. média</i>	<i>temp. mín.</i>
2013	dezembro	37,9	28,81	28,81
2014	janeiro	41,3	30,87	23,6
	fevereiro	41,5	30,93	23,1
	março	40,5	31,15	24,8
	abril	40	30,09	24
	maio	36,5	28,87	21,5
	junho	36,9	28,47	20,4
	julho	37,9	28,02	20,6
	agosto	37,3	27,98	19,8

Há diferenças significativas entre as temperaturas mensais do solo (Kruskal-Wallis, $p = 0$) (**Figura 11**). As temperaturas mais altas são observadas nos meses de janeiro, fevereiro e março e não há diferenças significativas entre elas (Tukey's Test, $p > 0,18$), seguidas pela temperatura observada em abril. Não há diferenças significativas entre as temperaturas observadas em julho e agosto (Tukey's Test, $p = 1$), sendo as mais baixas.

Figura 11 – Valores mensais das temperaturas mínimas, médias e máximas (°C) da camada sub-superficial do solo (barras lisas) e do ar (barras pontilhadas) em um ponto na localidade de Alagoado.

A amplitude entre as temperaturas médias do ar observadas em Alagoado foi igual a 6,75 °C, enquanto para a camada sub-superficial do solo a amplitude térmica foi de 3,7 °C entre as médias mensais. As médias do solo permaneceram entre, aproximadamente, 28 °C e 31 °C, já as médias de temperatura do ar variaram entre, aproximadamente, 25 °C e 32 °C.

3.4. *Calyptommatus leiolepis*

Através da inspeção das gônadas dos 388 indivíduos coletados de *C. leiolepis*, foram identificados 119 machos e 255 fêmeas, 14 indivíduos permaneceram sem a identificação do sexo. Esses indivíduos (coletados em março, maio, agosto e dezembro de 2013 e abril de 2014), pela ausência ou tamanho muito reduzido das gônadas, não puderam ser claramente sexados.

A menor fêmea, coletada em abril de 2014, apresentou **CRC** de 37,34 mm e a maior fêmea apresentou **CRC** de 79,01 mm, coletada em junho de 2013. O menor macho, coletado em maio de 2013, apresentou **CRC** de 34,9 mm, enquanto o maior macho apresentou **CRC** de 64,8 mm e foi coletado em março de 2013. Entre os indivíduos cujo sexo não foi identificado, o menor indivíduo apresentou **CRC** de 25,99 mm (coletado em março de 2013) e o maior apresentou **CRC** de 39,08 mm (coletado em agosto de 2013). A **Figura 12** mostra a distribuição sazonal dos comprimentos rostro-cloacais de todos os indivíduos coletados, agrupados pela condição de maturação das gônadas.

A menor fêmea com folículos em vitelogênese secundária foi coletada em abril de 2014 e apresentou **CRC** de 54 mm, a maior, coletada em junho de 2013, apresentou **CRC** de 79,01 mm. As fêmeas com comprimento rostro-cloacal inferior a 54 mm apresentaram ovidutos pouco desenvolvidos, variando de translúcidos a levemente opacos, mas sempre muito lisos. O menor macho com ductos deferentes bastante opacos e enovelados apresentou **CRC** de 47,21 mm (coletado em maio de 2013) e apenas dois indivíduos com **CRC** superior a este apresentaram ductos translúcidos e lisos. O menor macho que apresentou espermatozoides em seus túbulos seminíferos foi coletado em fevereiro de 2014 e seu **CRC** foi de 44,95 mm (**Figura 13**).

Figura 12 – Distribuição sazonal do comprimento rostro-cloacal dos indivíduos de *C. leiolepis*. Quadrados abertos, indivíduo sem sexo determinado; círculos pretos abertos, fêmeas maduras; círculos pretos fechados, fêmeas imaturas; círculos vermelhos abertos, machos maduros; círculos vermelhos fechados, machos imaturos.

O tamanho mínimo da maturidade sexual das fêmeas foi de 54 mm e para os machos 44,95 mm. O tamanho da maturidade sexual dos machos é cerca de 87,24% do tamanho da maturidade sexual das fêmeas. A média do **CRC** dos indivíduos sem sexo determinado ($N = 14$) foi $30,74 \pm 3,98$ mm. A média do **CRC** das fêmeas adultas ($N = 244$) foi de $64,62 \pm 4,33$ mm, enquanto a média do **CRC** das fêmeas sub-adultas ($N = 11$) de $48,98 \pm 5,53$ mm. A média do **CRC** dos machos adultos ($N = 116$) foi de $56,02 \pm 4,01$ mm e a média do **CRC** dos machos sub-adultos ($N = 3$) de $37,83 \pm 4,71$ mm. A **Tabela 5** resume as informações sobre os valores médios, mínimos e máximos para cada um dos caracteres analisados, em cada sexo.

Entre os indivíduos sub-adultos foram observados onze fêmeas e três machos e a razão sexual foi igual a 3,67, diferindo significativamente da razão esperada de 1:1 ($\chi^2 = 4,57$, $p = 0,03$, g.l. = 1). Entre os indivíduos adultos há 244 fêmeas e 116 machos, sendo a razão sexual igual a 2,1, diferindo da razão esperada ($\chi^2 = 45,51$, $p = 0$, g.l. = 1).

Figura 13 – Histologia e morfologia do ducto deferente e testículo de dois machos de *C. leirolepis*. (A e B) indivíduo com **CRC** = 44,95 mm, no qual se observam espermatozoides (ponta da seta). (C e D) indivíduo com **CRC** = 43,27 mm, com túbulos seminíferos não desenvolvidos.

Tabela 5 – Médias, desvio padrão, valores máximos e mínimos para os cinco caracteres morfométricos de fêmeas ($N = 244$) e machos ($N = 116$) adultos de *Calyptommatatus leirolepis*. * fêmeas ($N = 73$) e machos ($N = 34$).

	<i>fêmeas</i>			<i>machos</i>		
	Média ± Desv. Padrão	Mín.	Máx.	Média ± Desv. Padrão	Mín.	Máx.
CCA	6,09 ± 0,37	5,16	8,4	5,51 ± 0,39	3,55	6,22
ACA	3,02 ± 0,26	2,52	3,9	2,62 ± 0,49	2,21	3,48
LCA	4,28 ± 0,3	3,53	5,15	3,86 ± 0,32	2,9	5,74
CRC	64,62 ± 4,33	54	79,01	56,02 ± 3,48	44,92	64,8
CC*	42,49 ± 5,29	25,24	51,92	38,41 ± 6,36	22,77	47,58

Em relação ao tamanho absoluto foi observada a ocorrência de dimorfismo sexual em todos os caracteres analisados ($p = 0$), sendo as fêmeas em média maiores do que os machos. O grau de dimorfismo sexual em tamanho foi igual a 0,15. Não foi observado dimorfismo sexual em relação à forma da cabeça ($p > 0,2$). A **Tabela 6** mostra os resultados dos testes de dimorfismo sexual em tamanho absoluto e relativo. Não foram observadas diferenças na coloração dos indivíduos adultos de *C. leiolepis*.

Tabela 6– Resultados das análises de dimorfismo sexual, em relação ao tamanho absoluto e relativo dos caracteres, entre indivíduos adultos de *C. leiolepis*. Os valores < 0,05 estão em destaque.

		<i>tamanho absoluto</i>				<i>tamanho relativo</i>			
		CCA	ACA	LCA	CRC	CC	CCA	ACA	LCA
Shapiro-Wilk	fêmeas	0	0	0,40	0,27	0,001	0	0	0,87
	machos	0	0,04	0	0,012	0	0	0,17	0
Levene		0,48	0,41	0,62	0,86	0,004	0,16	0,48	0,61
Anova	F	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-
Mann-Whitney		0	0	0	0	0,001	0,20	0,22	0,50

Os folículos não vitelogênicos variaram entre zero e cinco, sendo dois e três os números mais comuns. A ausência de folículos não vitelogênicos foi observada em três fêmeas, mas só em um dos ovários (duas vezes no ovário direito e uma vez no ovário esquerdo), sendo que duas delas apresentaram folículos em vitelogênese secundária. Em 51,37% das fêmeas observou-se simetria entre o número de folículos não vitelogênicos em cada um dos ovários, porém nas fêmeas com assimetria no número destes folículos, não há uma regra sobre qual ovário, esquerdo ou direito, apresenta o maior número.

Das 84 fêmeas que apresentaram folículos em vitelogênese secundária, apenas seis apresentaram folículos vitelogênicos em número diferente de dois. Duas fêmeas (coletadas em fevereiro e maio de 2013) apresentaram apenas um folículo vitelogênico. Uma fêmea, coletada em junho de 2013, apresentou apenas um folículo, mas puderam ser observados corpos lúteos em seus ovários. Uma fêmea, coletada em julho de 2013, apresentou três folículos vitelogênicos, um no ovário direito e dois no ovário esquerdo e duas fêmeas,

coletadas em junho de 2014, apresentaram um folículo vitelogênico em um ovário e um que parecia estar em regressão no outro.

O menor folículo vitelogênico foi observado em maio de 2013 e media 0,88 mm X 0,71 mm e o maior, observado no mesmo mês, media 7,43 mm X 3,98 mm. Em todas as fêmeas grávidas foram observados dois ovos oviducais, sendo o direito cranial. O menor ovo media 5,12 mm X 3,37 mm e foi observado em fevereiro de 2014, o maior foi observado em julho de 2014 e media 10,97 mm X 4.14 mm. As medidas de comprimento e largura dos folículos vitelogênicos e ovos oviducais, assim como suas aparências gerais, indicam que o crescimento é maior no eixo longitudinal ao eixo do corpo da fêmea. A ovulação pode ocorrer por volta dos 5 mm de comprimento do folículo. A **Figura 14** apresenta o tamanho dos folículos vitelogênicos e ovos oviducais agrupados pelos meses do ano.

Figura 14 – Distribuição sazonal do comprimento dos folículos em vitelogênese secundária ou ovos. Círculos fechados, folículos vitelogênicos; círculos abertos, ovos oviducais.

Das 244 fêmeas adultas, 40 (15,68%) apresentaram ovos oviducais, 84 (32,94%) apresentaram folículos em vitelogênese secundária e 45 (18,44%), embora não tenham apresentado folículos vitelogênicos ou ovos oviducais,

apresentaram ovidutos muito desenvolvidos (bastante opacos e pregueados), indicam que haviam passado por uma desova recente. As fêmeas com evidência de desova recente foram coletadas em janeiro, fevereiro, março, maio, julho, agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2013 e janeiro, fevereiro, abril, maio e junho de 2014. No total foram observadas 168 fêmeas (68,85%) em estado reprodutivo. A **Figura 15** apresenta a porcentagem mensal de fêmeas reprodutivas, incluindo aquelas que apresentaram evidência de desova recente. As fêmeas grávidas apresentaram pouco ou nenhum corpo adiposo, enquanto a quantidade de gordura abdominal nas fêmeas com folículos em vitelogênese secundária variou de ausente a muito, sendo pouco frequente este último.

Figura 15 – Porcentagem mensal de fêmeas em estado reprodutivo de *Calyptommatus leiolepis*.

Fêmeas imaturas ocorrem em janeiro, fevereiro, março, abril, maio, julho e dezembro, e concentram-se na porção inferior do gráfico (**Figura 16**). Fêmeas adultas, porém não reprodutivas, foram observadas em dez meses do ano, com exceção de junho e agosto. As fêmeas pré-vitelogênicas, mas com evidência de desova recente, foram observadas em todos os meses

amostrados em 2013, com exceção de junho e nos meses de janeiro a junho em 2014.

Folículos vitelogênicos foram observados nos primeiros oito meses do ano e em novembro, enquanto os ovos foram observados em todos os meses, com exceção de outubro e dezembro, indicando que os períodos de cópula e de postura dos ovos devem ocorrer continuamente ao longo do ano. Pelo número de fêmeas vitelogênicas e grávidas, a cópula e a postura devem ser mais intensas entre maio e agosto. A observação do menor ovo em fevereiro e de um folículo próximo ao tamanho mínimo de ovulação em novembro indica um possível período de crescimento folicular de três meses. O menor indivíduo foi coletado em março de 2013 ($CRC = 25,99$ mm) e fêmeas com evidência de desova recente foram observadas em dezembro, indicando que o período de incubação pode ser de aproximadamente dois meses.

Figura 16 – Distribuição sazonal do comprimento rostro-cloacal das fêmeas de *C. leirolepis*. Quadrados abertos, fêmeas imaturas; paralelogramos abertos, fêmeas adultas com folículos não vitelogênicos; círculos vermelhos abertos, fêmeas não vitelogênicas com evidência de desova recente; círculos pretos fechados, fêmeas com folículos vitelogênicos e círculos pretos abertos, fêmeas com ovos.

Foi observada diferença significativa de tamanho entre ovos oviducais direito e esquerdo (Mann-Whitney, $p = 0$), sendo a média dos ovos direitos 9,34

$\pm 1,23$ mm e a dos esquerdos $8,38 \pm 0,98$ mm. Não foram observadas diferenças significativas entre os folículos vitelogênicos direito (média $3,36 \pm 1,26$ mm) e esquerdo (média $3,44 \pm 1,31$ mm) (ANOVA, $p = 0,70$ e $F = 0,148$). Não foi observada correlação significativa entre o **CRC** das fêmeas e o comprimento dos folículos ($R^2 = 0,003$), nem entre o **CRC** das fêmeas e o comprimento dos ovos ($R^2 = 0,004$).

A média do volume dos testículos direitos dos machos, independente do estado de maturação, foi de $0,83 \pm 0,51$ mm e a dos testículos esquerdos $0,81 \pm 0,51$ mm (**Figura 17**). Não houve variação significativa entre o volume dos testículos direito e esquerdo (Mann-Whitney, $p = 0,87$). A média do volume testicular total de machos adultos foi $1,66 \pm 0,88$ mm e a média dos machos imaturos $0,25 \pm 0,42$ mm, e foi observada diferenças significativas entre eles (Mann-Whitney, $p = 0,002$). O volume total dos testículos tem correlação significativa e positiva com o **CRC** dos indivíduos imaturos ($R^2 = 0,63$), mas não houve correlação significativa entre o **CRC** dos machos adultos e seus volumes testiculares totais ($R^2 = 0,106$) (**Figura 18**). Foi observada variação mensal no volume testicular total dos adultos (Kruskal-Wallis, $p = 0,006$), sendo os meses de agosto a dezembro os com menores volumes testiculares.

Figura 17 – Distribuição sazonal do volume testicular total de machos de *C. leioplepis*. Círculos abertos, machos maduros e círculos fechados, machos imaturos.

A correlação entre o mês de observação do menor indivíduo da amostra (março) e da observação da menor fêmea com evidência de maturidade sexual (abril) indica que as fêmeas demoram aproximadamente treze meses para atingir a maturidade sexual, podendo participar da estação reprodutiva seguinte ao seu nascimento. A correlação entre o mês de observação do menor indivíduo da amostra (março) e da observação do menor macho com evidência de maturidade sexual (maio), não permite estipular a idade da maturação sexual dos machos. Correlacionando o mês do menor indivíduo, com o mês de setembro, no qual se observam machos com **CRC** pouco maior do que o da maturidade sexual dos machos, o tempo para a maturação pode ser de aproximadamente seis meses.

Figura 18 – Retas de regressão linear do comprimento rostro-cloacal pelo volume testicular total de machos juvenis e adultos de *C. leiolepis*. Em preto, indivíduos adultos e em vermelho, indivíduos juvenis.

3.5. *Nothobachia ablephara*

Através da inspeção das gônadas dos 180 espécimes de *N. ablephara*, foram identificados 94 machos e 70 fêmeas. Permaneceram sem identificação do sexo 16 indivíduos (coletados em janeiro, março, junho, julho, agosto e novembro de 2013 e abril e agosto de 2014). A identificação do sexo destes indivíduos foi prejudicada ou pela não observação das gônadas ou por se apresentarem como esferas minúsculas que não puderam ser definidas como ovários ou testículos.

A menor fêmea apresentou **CRC** de 36,76 mm e foi coletada em setembro de 2013, a maior fêmea apresentou **CRC** de 62,39 mm e foi coletada em janeiro de 2013. O **CRC** do menor macho, coletado em agosto de 2013, foi de 28,2 mm e o **CRC** do maior macho, coletado em fevereiro de 2013, foi 56,57 mm. Entre os indivíduos cujo sexo não foi identificado, o menor apresentou **CRC** de 22,21 mm (coletado em janeiro de 2013) e o maior apresentou **CRC** 34,78 mm (coletado em novembro de 2013). A **Figura 19** mostra a distribuição dos comprimentos rostro-cloacais de todos os indivíduos coletados, agrupados pelos meses de captura.

Figura 19 – Distribuição sazonal do comprimento rostro-cloacal dos indivíduos de *N. ablephara*. Quadrados abertos, indivíduo sem sexo determinado; círculos pretos abertos, fêmeas maduras; círculos pretos fechados, fêmeas imaturas; círculos vermelhos abertos, machos maduros; círculos vermelhos fechados, machos imaturos.

A menor fêmea com folículos em vitelogênese secundária, coletada em fevereiro de 2013, apresentou **CRC** de 47,16 mm, seu folículos não puderam ser medidos, pois se encontravam danificados e a maior, coletada em janeiro de 2013, apresentou **CRC** de 62,39 mm. Todas as fêmeas com comprimento rostro-cloacal inferior aos 47,16 mm apresentaram ovidutos não desenvolvidos (translúcidos e lisos). O menor macho que apresentou espermatozoides em seus túbulos seminíferos foi coletado em novembro de 2013 e seu **CRC** foi de 37,38 mm (**Figura 20**). Todos os machos com **CRC** inferior a 37,38 mm apresentaram ductos deferentes translúcidos e com enovelamentos bastante sutis. Em todos os machos com **CRC** entre 35 mm e 45 mm que apresentaram espermatozoides em seus túbulos seminíferos, também foram observados ductos deferentes bastante opacos e enovelados (**Figura 20**). O maior macho com ductos deferentes bastante desenvolvidos apresentou **CRC** de 53,74 mm e foi coletado em fevereiro de 2013.

O tamanho mínimo da maturidade sexual das fêmeas foi de 47,16 mm e para os machos foi 37,38 mm. O tamanho da maturidade sexual dos machos é cerca de 80% do tamanho da maturidade sexual das fêmeas. A média do **CRC** dos indivíduos sem sexo determinado ($N = 16$) foi de $28,62 \pm 3,1$ mm. A média do **CRC** das fêmeas adultas ($N = 58$) de $55,47 \pm 3,74$ mm, enquanto a média do **CRC** das fêmeas sub-adultas ($N = 12$) foi $40,97 \pm 3,75$ mm. A média do **CRC** dos machos adultos ($N = 83$) foi de $47,67 \pm 3,75$ mm e a média do **CRC** dos machos sub-adultos ($N = 11$) de $33,47 \pm 3,03$ mm.

Entre os indivíduos sub-adultos foram observados onze machos e doze fêmeas e a razão sexual foi igual a 1,09, não diferindo significativamente da razão esperada de 1:1 ($\chi^2 = 0,04$, $p = 0,83$, g.l. = 1). Entre os indivíduos adultos há 58 fêmeas e 83 machos, sendo a razão sexual igual a 0,69, diferindo da razão esperada ($\chi^2 = 4,43$, $p = 0,03$, g.l. = 1).

Figura 20 – Histologia e morfologia do ducto deferente e testículo de dois machos de *N. ablephara*. (A e B) indivíduo de **CRC** = 37,38 mm, no qual se observam muitas espermatídes (seta vermelha) e muitos espermatozoides (seta preta). (C e D) indivíduo de **CRC** = 44,71 mm, no qual se observam espermatídes (seta vermelha) e espermatozoides (seta preta).

Em relação ao tamanho absoluto foi observada a ocorrência de dimorfismo sexual em todos os caracteres analisados ($p = 0$), sendo as fêmeas maiores do que os machos. O grau de dimorfismo sexual em tamanho foi igual a 0,16. Não foi observado dimorfismo sexual em relação à forma da cabeça ($p > 0,98$). A **Tabela 7** resume as informações sobre os valores médios, mínimos e máximos para cada um dos caracteres analisados, em cada sexo e a **Tabela 8** os resultados dos testes de dimorfismo sexual em tamanho absoluto e relativo. Não foram observadas diferenças na coloração dos indivíduos adultos de *N. ablephara*.

Tabela 7 – Média, desvio padrão, valores máximos e mínimos para os cinco caracteres morfométricos de fêmeas ($N = 58$) e machos ($N = 83$) adultos de *Nothobachia ablephara*. * fêmeas ($N = 17$) e machos ($N = 26$).

	<i>fêmeas</i>			<i>machos</i>		
	Média ± Desv. Padrão	Mín.	Máx.	Média ± Desv. Padrão	Mín.	Máx.
CCA	5,05 ± 0,43	4,07	6,05	4,65 ± 0,44	3,67	5,65
ACA	2,35 ± 0,2	1,91	2,9	2,09 ± 0,25	1,52	2,67
LCA	3,19 ± 0,22	2,71	3,7	2,86 ± 0,26	2,28	3,45
CRC	55,47 ± 3,74	47,16	62,39	47,67 ± 3,74	37,38	56,57
CC*	59 ± 5,39	49,57	69,31	50,14 ± 7,48	35,88	61,09

Tabela 8 – Resultados das análises de dimorfismo sexual, em relação ao tamanho absoluto e relativo dos caracteres, entre indivíduos adultos de *Nothobachia ablephara*. Os valores < 0,05 estão em destaque.

		<i>tamanho absoluto</i>					<i>tamanho relativo</i>		
		CCA	ACA	LCA	CRC	CC	CCA	ACA	LCA
Shapiro-Wilk	fêmeas	0,28	0,85	0,68	0,35	0,72	0,12	0,85	0,16
	machos	0,06	0,06	0,05	0,01	0,07	0,58	0,51	0,78
Levene		0,30	0,006	0,13	0,57	0,07	0,47	0,03	0,78
Anova	F	26,89	-	56,01	-	17,75	0	-	0
	P	0	-	0	-	0	1	-	1
Mann-Whitney		-	0	-	0	-	-	0,98	-

O número de folículos não vitelogênicos variou entre zero e cinco, sendo três o número mais comum. A ausência de folículos não vitelogênicos ocorreu apenas em duas fêmeas, uma não apresentou folículos em nenhum dos dois ovários e a outra não possuía folículos no ovário direito, mas apresentou três folículos no ovário esquerdo. Em 67% das fêmeas o número de folículos não vitelogênicos era o mesmo nos dois ovários, porém nas fêmeas com assimetria no número destes folículos, não há uma regra sobre qual ovário, esquerdo ou direito, apresenta o maior número.

Com exceção de uma única fêmea, coletada em julho de 2014 que apresentou apenas um folículo em vitelogênese secundária, as demais apresentaram folículos vitelogênicos sempre aos pares, sendo o direito cranial. Não há uma regra sobre qual ovário apresenta o maior folículo em vitelogênese

secundária. O menor folículo em vitelogênese secundária foi observado em agosto de 2013 e media 0,95 mm X 0,79 mm e o maior, observado em maio de 2014, media 4,31 mm X 2,59 mm. Em, todas as fêmeas foram observados dois ovos oviducais, sendo o direito cranial. O menor ovo, observado em março de 2013, media 6,44 mm X 2,53 mm e o maior, observado em maio de 2013, media 9,61 mm X 3,05 mm. As medidas de comprimento e largura dos folículos vitelogênicos e ovos oviducais, assim como suas aparências gerais, indicam que o crescimento é maior no eixo longitudinal ao eixo do corpo da fêmea. A **Figura 21** apresenta o tamanho dos folículos vitelogênicos e ovos oviducais agrupados pelos meses do ano.

Figura 21 – Distribuição sazonal do comprimento dos folículos em vitelogênese secundária ou ovos. Círculos fechados, folículos vitelogênicos; círculos abertos, ovos oviducais.

Das 58 fêmeas adultas, 16 (27,6%) apresentaram folículos em vitelogênese secundária, oito (13,8%) apresentaram ovos oviducais e Nove fêmeas (coletadas em janeiro, fevereiro, maio, junho, julho e agosto de 2013 e abril de 2014) que não apresentaram folículos vitelogênicos, apresentaram ovidutos bastante opacos e pregueados, indicando que haviam passado por uma desova recente. No total foram observadas 33 (56,9%) das fêmeas amostradas como reprodutivas. A **Figura 22** apresenta a porcentagem mensal

de fêmeas reprodutivas, incluindo aquelas que apresentaram ovidutos desenvolvidos, mas sem folículos em vitelogênese. Todas as fêmeas grávidas não apresentaram corpos adiposos, enquanto a quantidade de gordura nas fêmeas com folículos em vitelogênese secundária variou de ausente a média. Em nenhuma fêmea foi observada evidência de múltiplas desovas.

Figura 22 – Porcentagem mensal de fêmeas adultas em estado reprodutivo de *Nothobachia ablephara*.

Fêmeas imaturas ocorrem em quase todos os meses do ano, com exceção de março, maio, outubro e novembro, e concentram-se na porção inferior do gráfico (**Figura 23**). Fêmeas adultas, porém não reprodutivas, foram observadas em dez dos doze meses do ano, com exceção de março e maio. As fêmeas pré-vitelogênicas, mas com evidência de desova recente foram observadas entre janeiro e agosto, com exceção do mês de março. Fêmeas com folículos em vitelogênese secundária foram observadas em janeiro, fevereiro, março, maio, junho e agosto de 2013 e abril, maio e julho de 2014. Fêmeas grávidas foram observadas em fevereiro, março e maio de 2013 e janeiro, abril e agosto de 2014. Uma fêmea grávida foi coletada para outros fins nos primeiros dias do mês de dezembro de 2013 e não encontra-se plotada na **Figura 23**.

Folículos vitelogênicos foram observados nos primeiros oito meses do ano, enquanto os ovos começam a ser observados em dezembro, indicando que os períodos de cópula e de postura dos ovos devem ocorrer continuamente ao longo de todo o ano. Pelo número de fêmeas vitelogênicas e grávidas, a cópula deve ser mais intensa nos primeiros oito meses do ano. Pela observação do primeiro ovo em dezembro e o primeiro folículo vitelogênico antes disso tendo sido observado em agosto, além de folículos grandes terem sido observados em maio e um ovo pequeno em agosto, o período de crescimento folicular parece ter duração de 3 a 4 meses. O menor indivíduo foi coletado em janeiro de 2013 (**CRC** = 22,21 mm) e uma fêmea ovada foi observada nos primeiros dias de dezembro, indicando que o período de incubação pode ser de aproximadamente dois meses.

Figura 23 – Distribuição sazonal do comprimento rostro-cloacal das fêmeas de *N. ablephara*. Quadrados abertos, fêmeas imaturas; paralelogramos abertos, fêmeas adultas com folículos não vitelogênicos; círculos vermelhos abertos, fêmeas não vitelogênicas com evidência de desova recente; círculos pretos fechados, fêmeas com folículos vitelogênicos e círculos pretos abertos, fêmeas com ovos.

Não foi observada diferença significativa de tamanho entre ovos oviduais direito e esquerdo (ANOVA, $p = 0,21$), sendo a média dos ovos

direitos de $7,18 \pm 0,41$ mm e a do esquerdo $6,86 \pm 0,40$ mm. Também não foram observadas diferenças significativas entre os folículos vitelogênicos direito (média = $2,54 \pm 0,41$ mm) e esquerdo (média = $2,46 \pm 0,47$ mm) (ANOVA, $p = 0,61$). Não foi observada correlação significativa entre o **CRC** das fêmeas e o comprimento dos folículos ($R^2 = 0,05$), nem entre o **CRC** das fêmeas e o comprimento dos ovos ($R^2 = 0,09$).

A média do volume do testículo direito dos machos, independente do estado de maturação, foi de $0,27 \pm 0,15$ mm e a do testículo esquerdo de $0,29 \pm 0,15$ mm. Não houve variação significativa entre o volume dos testículos direito e esquerdo (ANOVA, $p = 0,55$). A média do volume testicular total de machos adultos foi de $0,63 \pm 0,21$ mm e a média dos machos imaturos $0,1 \pm 0,11$ mm, e houve diferenças significativas entre eles (Mann-Whitney, $p = 0$) (**Figura 24**). O volume total dos testículos tem correlação significativa e positiva com o **CRC** dos indivíduos imaturos ($R^2 = 0,59$), mas não houve correlação entre o **CRC** dos machos adultos e seus volumes testiculares totais ($R^2 = 0,17$). Em relação ao volume total dos machos adultos, não houve variação mensal (ANOVA, $p = 0,152$).

Figura 24 – Distribuição sazonal do volume testicular total de machos de *N. ablephara*. Círculos abertos, machos maduros e círculos fechados, machos imaturos.

3.6. *Procellosaurinus tetradactylus*

Dos 47 indivíduos de *P. tetradactylus* obtidos, foram identificados, através da inspeção das gônadas, 18 fêmeas e 28 machos. Um indivíduo, coletado em abril de 2014, não teve o sexo identificado. Neste indivíduo as gônadas se apresentaram como esferas minúsculas que não puderam ser definidas como ovários ou testículos.

A menor fêmea apresentou **CRC** de 20,74 mm e foi coletada em agosto de 2013, a maior fêmea apresentou **CRC** de 35,1 mm e foi coletada em janeiro de 2013. O **CRC** do menor macho, coletado em julho de 2013, foi de 21,52 mm e o **CRC** do maior macho, coletado em maio de 2014, de 32,32 mm. O indivíduo cujo sexo não pôde ser identificado foi também o menor indivíduo da amostra com **CRC** de 17,81 mm. A **Figura 25** mostra a distribuição dos comprimentos rostro-cloacais de todos os indivíduos coletados, agrupados pelos meses de captura.

Figura 25 – Distribuição sazonal do comprimento rostro-cloacal dos indivíduos de *P. tetradactylus*. Quadrados abertos, indivíduo sem sexo determinado; círculos pretos abertos, fêmeas maduras; círculos pretos fechados, fêmeas imaturas; círculos vermelhos abertos, machos maduros; círculos vermelhos fechados, machos imaturos.

A menor fêmea com folículos em vitelogênese secundária apresentou **CRC** de 31,33 mm (coletada em agosto de 2013) e a maior, coletada em janeiro de 2013, apresentou **CRC** de 35,1 mm. Uma fêmea de **CRC** de 29,04 mm, coletada em fevereiro de 2014, embora não possuísse folículos em vitelogênese secundária ou ovos oviducais, apresentou ovidutos bastante desenvolvidos (coloração branco-leitosa e altamente pregueados). O menor macho que apresentou ductos deferentes bastante opacos e enovelados foi coletado em outubro de 2013, e seu **CRC** foi de 25,17 mm e o maior, coletado em maio de 2014, apresentou **CRC** de 32,32 mm. Com exceção de um macho, coletado em maio de 2013, todos os machos com comprimento rostro-cloacal superior a 25,17 mm apresentaram ductos opacos e enovelados.

O tamanho mínimo da maturidade sexual das fêmeas foi de 29,04 mm e para os machos foi 25,17 mm. O tamanho da maturidade sexual das fêmeas é cerca de 15% maior que o dos machos. A média do **CRC** das fêmeas adultas ($N = 14$) foi de $32,84 \pm 1,82$ mm, enquanto a média do **CRC** das fêmeas sub-adultas ($N = 4$) $23,76 \pm 2,34$ mm. A média do **CRC** dos machos adultos ($N = 21$) foi $29,81 \pm 2,4$ mm e a média do **CRC** dos machos sub-adultos ($N = 6$) $23,93 \pm 1,22$ mm.

Entre os indivíduos sub-adultos foram observados seis machos e quatro fêmeas, sendo a razão sexual igual a 0,67, não diferindo significativamente da razão esperada de 1:1 ($\chi^2 = 0,4$, $p = 0,53$, g.l. = 1). Entre os indivíduos adultos foram observados 14 fêmeas e 21 machos, sendo a razão sexual também igual a 0,67, não diferindo da razão esperada ($\chi^2 = 1,4$, $p = 0,24$, g.l. = 1).

Em relação ao tamanho absoluto foi observada a ocorrência de dimorfismo sexual apenas para o comprimento rostro-cloacal ($p = 0$), sendo as fêmeas maiores do que os machos (média do **CRC** das fêmeas = 32,84 mm; média do **CRC** dos machos = 29,87 mm). O grau de dimorfismo sexual em tamanho foi igual a 0,1. Não foi observado dimorfismo sexual em relação à forma da cabeça ($p > 0,57$). Alguns machos adultos apresentam a região gular com coloração vermelha, a cor não se manteve bem nítida nos indivíduos que foram fixados, mas é bastante marcada nos espécimes vivos. A **Tabela 9** resume as informações sobre os valores médios, mínimos e máximos para

cada um dos caracteres analisados, em cada sexo e a **Tabela 10** os resultados dos testes de dimorfismo sexual em tamanho absoluto e relativo.

Tabela 9 – Média, desvio padrão, valores máximos e mínimos para os cinco caracteres morfométricos de fêmeas ($N = 14$) e machos ($N = 21$) adultos de *Procellosaurinus tetradactylus*.

* fêmeas ($N = 1$) e machos ($N = 6$).

	<i>fêmeas</i>			<i>machos</i>		
	Média ± Desv. Padrão	Mín.	Máx.	Média ± Desv. Padrão	Mín.	Máx.
CCA	5,4 ± 0,21	5,05	5,81	5,35 ± 0,42	4,38	6,06
ACA	2,18 ± 0,2	1,73	2,52	2,18 ± 0,28	1,58	2,69
LCA	3,68 ± 0,26	3,19	4,33	3,54 ± 0,37	2,67	4,24
CRC	32,84 ± 1,82	29,04	35,1	29,87 ± 2,28	25,19	32,32
CC*	49,99			37,75 ± 6,5	25,95	44,1

Tabela 10 – Resultados das análises de dimorfismo sexual, em relação ao tamanho absoluto e relativo dos caracteres, entre indivíduos adultos de *Procellosaurinus tetradactylus*. Os valores < 0,05 estão em destaque.

		<i>tamanho absoluto</i>					<i>tamanho relativo</i>		
		CCA	ACA	LCA	CRC	CC	CCA	ACA	LCA
Shapiro-Wilk	fêmeas	0,85	0,24	0,17	0,44	0,53	0,02	0,66	0,11
	machos	0,10	0,76	0,03	0,004	0,21	0,002	0,57	0,76
Levene		0,04	0,22	0,12	0,18	0,22	0,10	0,47	0,64
Anova	F	-	0,002	-	-	0,12	-	0	0
	P	-	0,96	-	-	0,73	-	1	1
Mann-Whitney		0,96	-	0,45	0	-	0,32	-	-

O número de folículos não vitelogênicos variou entre um e cinco, sendo três o número mais comum. Nem sempre o número de folículos não vitelogênicos é o mesmo em cada um dos ovários e não há uma regra sobre qual ovário, esquerdo ou direito, possui maior número de folículos. Folículos em vitelogênese secundária foram sempre observados aos pares, um em cada ovário, sendo o direito cranial. O menor folículo em vitelogênese secundária foi observado em janeiro de 2013 e media 1,64 mm X 1,28 mm e o maior, observado em dezembro de 2013, media 3,49 mm X 2,7 mm. Em todas as fêmeas foram observados dois ovos oviducais, sendo o direito cranial. O menor ovo, observado em fevereiro de 2013, media 4,81 mm X 3,36 mm e o maior,

observado em junho de 2013, média 6,13 mm X 3,36 mm. A **Figura 26** apresenta o tamanho dos folículos vitelogênicos e ovos oviducais agrupados pelos meses do ano.

Figura 26 – Distribuição sazonal do comprimento dos folículos em vitelogênese secundária ou ovos. Círculos fechados, folículos vitelogênicos; círculos abertos, ovos oviducais.

Com exceção de uma fêmea, que apresentou ovidutos muito opacos e lisos, todas aquelas com folículos em vitelogênese secundária possuíam ovidutos bastante opacos e muito pregueados. As fêmeas grávidas apresentaram ovidutos esticados pelos ovos. Em nenhuma fêmea foi observada a presença de corpos lúteos ou evidências de múltiplas desovas.

A **Figura 27** apresenta a dispersão da condição de maturidade das fêmeas pelos seus comprimentos rostro-cloacais, agrupadas pelos meses amostrados. Fêmeas adultas, porém não reprodutivas, foram observadas em janeiro, agosto e outubro de 2013 e em fevereiro, maio e julho de 2014. Fêmeas com folículos em vitelogênese secundária foram coletadas em janeiro, março, agosto e dezembro de 2013. Fêmeas grávidas foram observadas em fevereiro e junho de 2013. Nenhuma fêmea reprodutiva foi observada nos primeiros oito meses de 2014. Das 14 fêmeas adultas, sete estavam reprodutivas, representando 50% da amostra. Pelo baixo número de fêmeas

coletadas por cada mês, não foi realizada a comparação entre a porcentagem de fêmeas reprodutivas mês a mês.

Figura 27 – Distribuição sazonal do comprimento rostro-cloacal das fêmeas de *P. tetradactylus*. Quadrados abertos, fêmeas imaturas; paralelogramos abertos, fêmeas adultas com folículos não vitelogênicos; círculos vermelhos abertos, fêmeas não vitelogênicas com evidência de desova recente; círculos pretos fechados, fêmeas com folículos vitelogênicos e círculos pretos abertos, fêmeas com ovos.

O primeiro folículo em vitelogênese foi observado em agosto e o primeiro ovo em fevereiro, indicando que o período de crescimento folicular tem duração mínima de seis meses, assim como o período de cópula. O período de postura dos ovos tem duração mínima de quatro meses, entre fevereiro e junho. A correlação entre a observação do primeiro ovo (fevereiro) e do menor indivíduo coletado (abril) indica um período de incubação de aproximadamente dois meses.

Não foi observada diferença significativa de tamanho entre ovos oviduciais direito e esquerdo ($p = 0,33$), sendo a média dos ovos direitos de $5,87 \pm 0,36$ mm e a do esquerdo $5,11 \pm 0,42$ mm. Também não foram observadas diferenças significativas entre os folículos vitelogênicos direito

(média $2,43 \pm 1,01$ mm) e esquerdo ($2,15 \pm 0,75$ mm) ($p = 0,78$). Não foi observada correlação significativa entre o **CRC** das fêmeas e o comprimento dos folículos ($R^2 = 0,27$), nem entre o **CRC** das fêmeas e o comprimento dos ovos ($R^2 = 0,35$).

A média do volume do testículo esquerdo dos machos (sub-adultos e adultos) foi de $0,32 \pm 0,32$ mm e a do testículo direito $0,35 \pm 0,28$ mm. Não há variação significativa entre o volume dos testículos direito e esquerdo (Mann-Whitney, $p = 0,55$). A média do volume testicular total de sub-adultos foi de $0,85 \pm 0,6$ mm e de sub-adultos $0,28 \pm 0,26$ mm, e houve diferença significativa entre eles (Mann-Whitney, $p = 0,01$). Não há correlação significativa entre o **CRC** de machos adultos e seus volumes testiculares totais ($R^2 = 0,05$) e não foi detectada variação mensal no volume testicular total dos indivíduos adultos (Kruskal-Wallis, $p = 0,23$). Embora as diferenças mensais no volume testicular não sejam significativas, os maiores volumes testiculares foram observados entre dezembro e maio (**Figura 28**).

Figura 28 – Distribuição sazonal do volume testicular total de machos de *P. tetradactylus*. Círculos abertos, machos maduros e círculos fechados, machos imaturos.

A correlação entre o mês de observação do menor indivíduo da amostra (abril) e da observação da menor fêmea com evidência de maturidade sexual

(fevereiro) indica que as fêmeas levam no mínimo dez meses para atingir a maturidade sexual. A correlação entre o mês de observação do menor indivíduo da amostra (abril) e da observação do menor macho com evidência de maturidade sexual (outubro) indica que os machos levam no mínimo seis meses para atingir a maturidade sexual. Com a estação reprodutiva se estendendo, aproximadamente 10 meses, machos alcançariam a maturidade sexual durante a primeira estação reprodutiva após o seu nascimento, enquanto as fêmeas atingiriam a maturidade sexual entre a primeira e segunda estação reprodutiva após o seu nascimento.

4. Discussão

Erro de medição

Poucos trabalhos que envolvem a obtenção e análise de dados morfométricos se preocupam com o cálculo do erro de medição. Sabe-se que valores elevados para erros de medição podem influenciar na interpretação dos dados obtidos, levando a conclusões equivocadas sobre padrões biológicos. Não há um valor exato de %EM para que um determinado caracter seja retirado da análise, mas valores por volta dos 20% são considerados extremamente altos (Marantz & Patten, 2010). Os valores de %EM observados neste trabalho não ultrapassaram os 11% e dessa forma, todos os caracteres merísticos foram utilizados nas análises futuras sem maiores preocupações relacionadas à sua validade.

Anatomia do aparelho reprodutor

A anatomia do aparelho reprodutor, tanto feminino quanto masculino, não apresentou grande variação entre as três espécies. A gônada direita é sempre cranial à esquerda e ambas posicionam-se lateralmente ao terço caudal do tubo digestivo. A diferença mais marcante é em relação à posição relativa das gônadas dentro da cavidade abdominal. Em *Procellosaurinus tetradactylus* as gônadas encontram-se em posição mais caudal, com a porção caudal do testículo esquerdo mais próxima à cloaca, podendo em alguns indivíduos estar na altura da mesma, enquanto que em *Calyptommatus leiolepis* e *Nothobachia ablephara* as gônadas se encontram em uma posição mais cranial da cavidade abdominal e tanto os ductos deferentes quanto os ovidutos se estendem por um longo comprimento até a cloaca.

Assim como observado em *Gymnophthalmus leucomystax* (Carvalho, 1992), as três espécies estudadas apresentam variação marcante na aparência do ovário e do oviduto devido aos diferentes estados reprodutivos. Fêmeas não reprodutivas apresentam ovários com folículos pequenos e de coloração variando de translúcida à branca e ovidutos são translúcidos ou levemente

opacos, mas sempre lisos. As fêmeas reprodutivas apresentam ovário hipertrofiado pela presença de um folículo vitelogênico de tamanho aumentado e coloração amarela, além de ovidutos bem opacos e com pregas bem evidentes. Nas fêmeas com folículos em vitelogênese secundária a posição dos folículos não vitelogênicos foi variável, porém permanecem sempre unidos. Corpos lúteos foram observados em *C. leiolepis* e *N. ablephara* e são reconhecidos por seu formato achatado e por uma bem marcada cicatriz longitudinal. Fêmeas que passaram por desova recente apresentam ovário pequeno com folículos não vitelogênicos, mas ovidutos bastante opacos e pregueados. Nos casos nos quais são observados os ovos oviducais, os ovários encontram-se achatados em posição dorsal aos ovos, enquanto os ovidutos estão esticados para acomodação dos ovos. Os testículos das três espécies são elipsoides, de coloração entre translúcida e opaca, sendo possível observar com clareza os túbulos seminíferos apenas nos indivíduos recém-sacrificados. Os ductos deferentes variam entre translúcidos e brancos e com graus distintos de enovelação, sendo bem evidente na maioria dos indivíduos adultos. Macroscopicamente os epidídimos são pouco visíveis nos indivíduos fixados, mostrando-se mais evidentes em indivíduos cujos testículos eram proporcionalmente muito grandes.

Embora *C. leiolepis* e *N. ablephara* apresentem um padrão corporal serpentiforme, as duas gônadas estão sempre presentes e não há redução lateral de uma delas, como se observa na maioria dos Amphisbaenidae e Serpentes (Andrade *et al.*, 2012; Atwood, 1916; Aveiro-Lins *et al.*, 2006; Crook & Parsons, 1980; Navega-Gonçalves, 2009; Navega-Gonçalves & da Silva, 2013; De Souza *et al.*, 2009). O padrão corporal serpentiforme evoluiu diversas vezes nos Squamata e as adaptações anatômicas para se adequar a este padrão nem sempre são as mesmas entre as diferentes linhagens (Gans, 1975; Diáz-Gómez, 2003; Pyron *et al.*, 2013). Estudos de desenvolvimento embrionário (Roscito, 2010), osteologia (Roscito & Rodrigues, 2010; Roscito & Rodrigues, 2013) e ecologia (Camacho, 2012) estão sendo realizados com os lagartos serpentiformes da família Gymnophthalmidae para melhor compreender os padrões envolvidos na evolução do morfotipo dentro do grupo. Para répteis de maneira geral pouco tem sido realizado em relação à anatomia

visceral e os dados referentes aos lagartos serpentiformes são basicamente nulos (Diáz-Gómez, 2003; Klein *et al.*, 2004), impossibilitando comparações mais sólidas sobre os padrões aqui observados.

Maturidade e razão sexual

O tamanho mínimo para a maturidade sexual das fêmeas é detectado através da observação da menor fêmea que apresenta folículos vitelogênicos, ovos oviduciais e/ou corpos lúteos em basicamente todos os trabalhos publicados sobre o assunto (Braz *et al.*, 2014; ; Cassel *et al.*, 2012; Cottone & Bauer, 2009; Dias, 2012; Garda *et al.*, 2012; entre outros), enquanto para os machos isto é feito seja através da morfologia de seus testículos e ductos, seja pela observação histológica da ocorrência de espermatozoides (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Anjos & Rocha, 2008; Ferreira *et al.*, 2009). Ainda que esta última seja a técnica mais precisa para tal, principalmente em animais relativamente pequenos, é a metodologia menos utilizada. Não há na literatura dados sobre o tamanho da maturidade sexual em *N. ablephara* e *P. tetradactylus*. Os dados deste trabalho sugerem que em *N. ablephara* as fêmeas atingem a maturidade sexual à aproximadamente 47 mm e machos aos 37 mm, esses valores parecem bem estimados, uma vez que as amostras representavam as diferentes classes de tamanho e pela observação de espermatozoides em todos os machos com **CRC** superior a este. Em *P. tetradactylus* os valores são de 29,04 mm e 25,17 mm, mas não foi possível realizar cortes histológicos dos machos. Os tamanhos de maturidade sexual de *P. tetradactylus* foram sutilmente inferiores aos observados em *Vanzosaura rubricauda* no Chaco (Cruz, 1994) (31,4 mm para as fêmeas e 28,8 mm para os machos) e em *V. multicustata* na Caatinga (como *Gymnophthalmus multiscutatus*, Vitt 1982) (31 mm para as fêmeas e 28 mm para os machos), gênero irmão a *Procellosaurinus* (Pellegrino *et al.*, 2001) e que atinge tamanhos corporais superiores ao de *Procellosaurinus*.

Os dados obtidos neste trabalho indicam que fêmeas de *C.leiolepis* atingem a maturidade sexual com comprimento rostro-cloacal de 54 mm, enquanto os machos aos 44,95 mm. Esses valores são superiores aos

observados por Moraes (1993), que relatou que fêmeas atingem a maturidade sexual aos 44 mm e machos aos 40 mm. No trabalho de Moraes (1993) não há análise histológica dos testículos, o que pode indicar que o valor de 40 mm não represente o tamanho mínimo ao qual machos produzem espermatozoides, uma vez que há dados para algumas espécies nas quais o volume testicular não está diretamente correlacionado com a produção de espermatozoides (Almeida-Santos *et al.*, 2014). Em relação às fêmeas, o tamanho da maturidade de 54 mm pode ser reflexo da amostragem, na qual há uma lacuna de fêmeas com comprimento rostro-cloacal inferior aos 50 mm.

Na literatura poucos são os trabalhos que apresentam dados sobre razão sexual (Carvalho, 1992; León & Ruiz, 1971; Ramos-Pallares *et al.*, 2010). A variação na razão sexual pode ser explicada por diferenças sexuais nas taxas de nascimento, sobrevivência e/ou comportamentais (Carvalho, 1992 Vitt, 1973). *P. tetradactylus* não apresentou variação na razão sexual de juvenis e adultos, sendo igual à razão esperada de 1:1. *N. ablephara* apresentou razão sexual igual a 1:1 nos indivíduos jovens, mas em relação aos adultos há aproximadamente 30% mais fêmeas do que machos. Não há evidências comportamentais que expliquem uma possível coleta diferencial de machos e fêmeas de *Nothobachia*, deixando em aberto a possibilidade de que os dois sexos estejam sujeitos a pressões seletivas distintas que reflitam em uma maior taxa de sobrevivência das fêmeas. Em *C. leiolepis* há três vezes mais fêmeas entre os jovens e duas vezes mais entre os adultos, indicando que possivelmente nasçam mais fêmeas do que machos na espécie, pois também não há dados comportamentais que possam sugerir uma coleta diferencial.

Dimorfismo sexual

A seleção, pela divergência intraespecífica de nicho e a seleção sexual são as duas principais explicações para a evolução do dimorfismo sexual (Shine, 1989; Zuffl *et al.*, 2011). Fêmeas e machos apresentam divergências em seus papéis reprodutivos e podem estar submetidos a diferentes pressões seletivas (Cox & Calsbeek, 2010), gerando diferenças morfológicas significativas entre os dois sexos. O dimorfismo sexual pode ocorrer em três

aspectos distintos: tamanho, forma e aspectos qualitativos, como por exemplo, coloração e presença/ausência de determinadas estruturas.

Em relação à coloração, *C. leiolepis* e *N. ablephara* não apresentam dimorfismo sexual, enquanto em *P. tetradactylus* apenas os machos adultos podem apresentar a região gular vermelho-alaranjada. Machos de *C. leiolepis* e *N. ablephara* apresentam poros na região pré-anal, enquanto as fêmeas não, esse mesmo padrão é observado em várias espécies de lagartos (López & Martín, 2005a; Martín & López, 2015; Pellitteri-Rosa *et al.*, 2014). Em *P. tetradactylus*, machos e fêmeas possuem poros pré-anais, porém em números distintos. Esses padrões qualitativos de dimorfismo sexual são os mesmos observados desde a descrição das espécies (Rodrigues, 1984; Rodrigues, 1991a; Rodrigues, 1991c). O padrão de coloração observado em *P. tetradactylus* é o mesmo observado em *P. erythrocercus* (Rodrigues, 1991c) e no gênero *Vanzosaura* (Recoder, 2012). A ausência de variação na coloração indica menor importância ou mesmo ausência dos sinais visuais em *C. leiolepis* e *N. ablephara*. Sinais visuais precisam de condições ambientais específicas (luz) e costumam ser utilizados em contatos a uma distância maior (Martín & López, 2012; Martín & López, 2015; Mason & Parker, 2010; Pellitteri-Rosa *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2013;), ambas dificultadas pelo hábito de vida fossorial dessas duas espécies.

Há uma ampla variedade de padrões de dimorfismo sexual em tamanho entre os lagartos, sendo um fator de interesse em estudos recentes (Cox & Calsbeek, 2009; Cox *et al.*, 2003; Feltrim, 2002; Shine, 1994; Zuffl *et al.*, 2011). Entre os representantes da família Gymnophthalmidae o dimorfismo sexual já foi detectado em várias espécies, mas é considerado raro para espécies fossoriais (Dal Vechio *et al.*, 2014; Diehl, 2007; Goldberg, 2009; Pianka & Vitt, 2003; Recoder *et al.*, 2014; Vitt, 1982). *P. tetradactylus* apresentou apenas dimorfismo sexual em relação ao tamanho rostro-cloacal dos indivíduos, sendo as fêmeas maiores, mas não apresentou dimorfismo sexual no tamanho ou forma da cabeça. Em *C. leiolepis* e *N. ablephara* há dimorfismo em tamanho para todos os caracteres, com fêmeas maiores e graus de dimorfismo similares, mas não há diferenças sexuais em relação à forma da cabeça. O padrão de dimorfismo sexual com fêmeas maiores do que os machos é

chamado de “dimorfismo reverso”, pois o padrão mais bem estudado é o de machos maiores do que fêmeas (Montechiaro, 2008).

A principal explicação para a ocorrência de dimorfismo em relação à forma da cabeça envolve a territorialidade por parte dos machos e a ocorrência de encontros agonísticos, seja para a proteção do território ou para garantir a cópula com fêmeas (Cox & Calsbeek, 2009; Cox *et al.*, 2003; Feltrim, 2002; Ramos-Pallares *et al.*, 2010). A ausência do dimorfismo sexual na forma da cabeça de *P. tetradactylus* confronta com as observações feitas em espécies do gênero *Vanzosaura*, que apresentam dimorfismo em relação aos membros e medidas da cabeça (Recoder *et al.*, 2014). Os dois gêneros são filogeneticamente próximos e compartilham algumas características morfológicas (são lacertiformes, machos apresentam coloração na região gular) e ecológicas (vivem no folhiço acumulado sob arbustos de áreas abertas, além de troncos etc) gerais, das quais se levantou a hipótese de que *Procellosaurinus* apresentaria um padrão de dimorfismo similar ao de *Vanzosaura*, com machos apresentando cabeças proporcionalmente maiores que poderiam ser vantajosas em encontros agonísticos ou no controle da fêmea durante a cópula. *N. ablephara* e, principalmente, *C. leiolepis* são encontrados em aglomerações, sendo pouco provável que machos sejam territorialistas e que entrem constantemente em confrontos agonísticos, sendo plausível a observação de que não possuam cabeças proporcionalmente maiores. Não há literatura e nem neste trabalho dados referentes ao comportamento de cópula e dados sobre dieta das duas espécies não realizaram comparações inter-sexuais (Rocha & Rodrigues, 2005), sendo assim não é possível levantar hipóteses consistentes relacionadas à ausência deste tipo de dimorfismo, não podendo ser excluída a ocorrência de divergência de nicho entre os sexos.

Em alguns lagartos de pequeno porte, a seleção pode favorecer fêmeas de tamanhos corporais maiores, independente do tamanho corporal dos machos, permitindo a produção de um maior número de ovos ou de ovos de tamanhos maiores, aumentando a fertilidade e/ou a sobrevivência da prole (Pianka & Vitt, 2003). *C. leiolepis*, *N. ablephara* e *P. tetradactylus*, assim como as demais espécies da família Gymnophthalmidae, tem ninhada fixa em dois

ovos (Fitch, 1970; Pianka & Vitt, 2003), e o tamanho dos ovos, embora apresente correlação positiva com o comprimento rostro-cloacal das fêmeas, esta não é significativa, o que inviabiliza a estes lagartos a explicação usual de que fêmeas maiores produzem mais ovos ou em maior tamanho não aplicável. O maior tamanho das fêmeas implica em uma maior cavidade abdominal, o que significa mais espaço para armazenar os ovos e provável redução de conflito entre gravidez (mesmo que temporária) e locomoção (Zanchi-Silva *et al.*, 2013; Pianka & Vitt, 2003). Essa explicação parece se adequar às três espécies do estudo, porém seria extremamente interessante a realização de trabalhos sobre fisiologia e locomoção de fêmeas grávidas e não grávidas para melhor compreender o quanto a presença de ovos podem afetar a capacidade de forragear e fugir de predadores.

Ciclo reprodutivo

C. leiolepis possui reprodução contínua ao longo do ano com porcentagem de fêmeas reprodutivas superior aos 50% em sete meses, sendo seis destes meses parte da típica estação seca da Caatinga. As maiores porcentagens de fêmeas reprodutivas foram observadas em junho e agosto, que correspondem ao meio da estação seca, enquanto que as menores porcentagens foram observadas nos meses de outubro e dezembro que correspondem ao final da estação seca e início da estação chuvosa, respectivamente. Em *N. ablephara* foram observadas fêmeas reprodutivas de janeiro a agosto, porém há dados de fêmeas grávidas em dezembro, indicando que fêmeas reprodutivas podem ser observadas em basicamente todos os meses ano. Dos oito meses nos quais foram coletadas fêmeas reprodutivas, em seis a porcentagem foi igual ou superior aos 50%, esses meses correspondem basicamente ao final da estação chuvosa e início da estação seca. Os dados referentes à *P. tetradactylus* indicam que fêmeas têm reprodução prolongada, provavelmente se estendendo ao longo de todo o ano, porém a quantidade de fêmeas adultas coletadas foi muito baixa, impedindo uma boa comparação da porcentagem mensal de fêmeas reprodutivas. Fêmeas grávidas foram observadas nos meses de fevereiro e junho, o primeiro

de estação chuvosa e o segundo de estação seca, enquanto fêmeas com folículos vitelogênicos foram observadas do final da estação seca (agosto) até o final da estação chuvosa (março).

De acordo com a literatura (Nimer, 1979; Rocha & Rodrigues, 2005), há uma típica estação seca para a região que se estende de abril a outubro, porém os dados obtidos neste trabalho indicam abril e maio como parte dos meses mais úmidos do ano, revelando a variabilidade das condições ambientais. Embora tenha sido observada variação mensal na umidade relativa do ar, apenas os meses de setembro e outubro apresentaram valores inferiores a 50%. O regime de chuvas na Caatinga é muito mais imprevisível do que sazonal e há dados que sugerem que espécies de répteis submetidas a chuvas inconstantes, podem adotar estratégia reprodutiva contínua (Ferreira *et al.*, 2011; Vitt, 1992; Zanchi-Silva *et al.*, 2013), ao contrário da reprodução sazonal esperada para espécies neotropicais em ambientes nos quais as chuvas não são constantes (Carvalho, 1992; Pianka & Vitt, 2003; dos Santos, 2013), como é o caso do Gymnophthalmidae *Micrablepharus maximiliani* em uma localidade de Cerrado com regime de chuva bastante previsível (Dal Vechio *et al.*, 2014) ou de *Vanzosaura rubricauda* em uma localidade do Chaco na Argentina (Cruz, 1994).

Vitt (1982) analisando o ciclo reprodutivo de *Vanzosaura multiscutata* identificou pela primeira vez reprodução contínua para lagartos na Caatinga e este padrão de reprodução contínua ou prolongada é considerado o típico para as espécies da família Gymnophthalmidae, desde que as condições ambientais se mostrem favoráveis (Pianka & Vitt, 2003). A não observação de ovos depositados na areia ao longo das quatro expedições ao campo revela que as fêmeas das três espécies procuram microhabitats com condições bastante restritas para depositar os ovos. O mesmo pode ser dito das fêmeas de *C. leiolepis*, *N. ablephara* e *P. tetradactylus*, todas com reprodução contínua ou, no mínimo, dita como prolongada, sendo a maior diferença observada no momento no qual há pico de fêmeas reprodutivas. Em *C. leiolepis* o pico de fêmeas reprodutivas ocorre logo após o segundo e terceiro meses mais úmidos do ano (abril e maio), no momento nos quais as temperaturas médias são mais baixas (junho e agosto). *N. ablephara* tem pico de fêmeas reprodutivas em

meses mais úmidos, porém com temperaturas mais amenas. As fêmeas de *P. tetradactylus* não apresentam pico reprodutivo aparente, mas fêmeas vitelogênicas foram observadas em maior quantidade em dezembro, mês mais úmido e bastante quente.

Não há variação mensal no volume testicular total dos machos de *N. ablephara* e de *P. tetradactylus* e em *C. leiolepis* os menores volumes testiculares foram observados entre agosto e dezembro. Entre os Gymnophthalmidae há casos de espécies com ciclo reprodutivo sazonal, mas com machos reprodutivos ao longo de todo o ano como, por exemplo, em *M. maximiliani* (Dal Vechio *et al.*, 2014) e *Cercosaura schreibersii* (Diehl, 2007); há o caso de *V. multiscutata* (Vitt, 1982), no qual os machos estão reprodutivos entre março e agosto, embora fêmeas reprodutivas sejam observadas ao longo de todo o ano e em *G. leucomystax* (Carvalho, 1992) machos encontram-se não reprodutivos apenas em um mês do ano. Em *C. leiolepis* a variação no volume testicular pode corresponder a um evento real de queda na produção de espermatozoides ou a um efeito de amostragem, uma vez que os meses com menor volume testicular são os meses com o menor número de machos adultos coletados. Pela observação de um macho coletado em agosto com espermatozoides em seus túbulos seminíferos, podemos hipotetizar que machos adultos de *C. leiolepis*, mesmo com valores relativamente pequenos de volume testicular, podem continuar produzindo espermatozoides.

Embora os ciclos reprodutivos sejam definidos principalmente pelas alterações observadas nas fêmeas (Vitt, 1982), a observação das possíveis variações nos volumes testiculares dos machos pode auxiliar na elucidação de outros aspectos do ciclo reprodutivo. Em espécies nas quais fêmeas reproduzem-se de maneira contínua, mas que machos apresentam clara fase de atrofia testicular, pode-se pressupor que as fêmeas sejam capazes de armazenar esperma por um determinado período após cópula (Marques *et al.*, 2009; Montechiaro, 2008). Da mesma forma, em espécies nas quais os machos estão reprodutivos ao longo de todo o ano, assim como as fêmeas, espera-se que a fertilização ocorra simultaneamente à cópula, sem o armazenamento de espermatozoides (Marques *et al.*, 2009; Montechiaro, 2008). Os dados obtidos neste trabalho indicam que machos adultos, mesmo

que apresentem volumes testiculares relativamente menores, podem produzir espermatozoides e que a disponibilidade de esperma para as fêmeas é contínua, não havendo motivos para o armazenamento por parte das mesmas, porém a confirmação desta hipótese necessita da análise histológica dos ovidutos.

Considerando que *C. leiolepis*, *N. ablephara* e *P. tetradactylus* são espécies que se enquadram no padrão de cópula e fertilização simultânea, que a fertilização ocorre após a ovulação (Carvalho, 1992) e que Roscito (2010) observou ovos em fêmeas de *C. sinebrachiatus* que ainda não haviam sido fertilizados, o período de cópula pode ser refinado de acordo com os meses nos quais se observam fêmeas com ovos oviducais ou com folículos em vitelogênese secundária com comprimento próximo ao dos menores ovos, indicando ovulação eminente. Em *C. leiolepis* cópula ocorre ao longo de todo o ano, apresentando pico em maio, junho e julho, meses nos quais além de fêmeas com ovos oviducais, há fêmeas com folículos vitelogênicos de tamanho similar aos dos menores ovos. *N. ablephara* apresenta período de cópula similar ao de *C. leiolepis*, porém com maior acúmulo de fêmeas com ovos oviducais nos primeiros três meses do ano. *P. tetradactylus* apresenta, provavelmente, cópula contínua, mas pelo baixo número de fêmeas reprodutivas coletadas é impossível delimitar um possível pico. O período de postura dos ovos pode ser determinado não apenas pela presença dos ovos oviducais, mas também pela ocorrência de fêmeas com ovidutos bastante opacos e pregueados e ausência de folículos vitelogênicos e/ou ovos oviducais (Almeida-Santos *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2014; Braz *et al.*, 2014; Carvalho, 1992). A postura de ovos é contínua em *C. leiolepis*, com evidência de desova recente nos meses de outubro e dezembro nos quais não são observados ovos oviducais. Para as fêmeas de *N. ablephara* evidências de desova recente foram observadas apenas ao longo dos primeiros oito meses do ano, porém como dito anteriormente, a informação sobre fêmeas com ovos oviducais em dezembro e a ocorrência de fêmeas vitelogênicas em agosto, indicam que a possibilidade de fêmeas com ovos oviducais em setembro, outubro e novembro seja alta, tornando assim a postura contínua ao longo do ano. Da mesma forma

que para cópula, é difícil delimitar com clareza o período de postura de *P. tetradactylus*, mas os dados indicam postura contínua.

A fecundidade das três espécies é de dois ovos por ninhada com pouca variação e esses dados estão de acordo com as informações conhecidas para as espécies de Gymnophthalmidae (Pianka & Vitt, 2003). A não correlação do tamanho da fêmea com o tamanho dos ovos pode ser um indicativo de que, evolutivamente, atingiu-se um equilíbrio entre volume do ovo e volume dos neonatos (Ramos-Pallares *et al.*, 2010). Apenas as fêmeas de *C. leiolepis* apresentaram evidências de múltiplas desovas em março, maio, junho e agosto. Embora o mês de março tenha baixa porcentagem de fêmeas reprodutivas, os demais são os meses com maior atividade reprodutiva por parte das fêmeas, indicam que sejam meses com condições realmente ideais para a reprodução da espécie nesta localidade. A ocorrência de múltiplas desovas é uma conhecida estratégia de espécies pequenas e com número fixo de ovos na tentativa de otimizar seus esforços reprodutivos (Anjos & Rocha, 2008; Garda *et al.*, 2014; Pianka & Vitt, 2003; Ramos-Pallares *et al.*, 2010; Roberto & Albano, 2012). No caso específico das três espécies de Alagoado, a ocorrência de múltiplas desovas em *C. leiolepis* pode ser parte da explicação de sua elevada densidade quando comparada à das outras duas espécies. Durante as expedições ao campo pudemos observar até 60 indivíduos de *C. leiolepis* em uma pequena área de aproximadamente 10 m², enquanto indivíduos de *N. ablephara* e, principalmente, *P. tetradactylus* eram encontrados em quantidades bastante inferiores.

O período de incubação de aproximadamente dois meses estimado para as três espécies vai de encontro aos dados observados no trabalho de Roscito (2010) que identificou embriões de *V. multiscutata* e *C. sinebrachiatus* em estágio de pré-eclosão entre 33 e 44 dias após postura dos ovos. No mesmo trabalho, Roscito fala da problemática de se definir os estágios de desenvolvimento do embrião pelo seu comprimento rostro-cloacal por ser esta uma característica variável entre os indivíduos que foram utilizados em seu trabalho. O menor indivíduo de *C. leiolepis* apresentou **CRC** igual a 25,99 mm, que é aproximadamente 6 mm superior ao tamanho do embrião de *C. sinebrachiatus* em estágio de pré-eclosão (19,73 mm) (Roscito, 2010). Para *N.*

ablephara e *P.tetradacytlus*, Roscito (2010) não foi capaz de estipular o tamanho corporal dos embriões em estágio de pré-eclosão, mas para *V. multiscutata* esse valor é igual a 15,9 mm. Com base nos dados obtidos por Roscito (2010) e pela variação possível no **CRC** de indivíduos diferentes, é plausível que os menores indivíduos coletados para as três espécies deste trabalho tenham comprimento rostro-cloacal próximo ao de um neonato.

Embora não seja possível definir com exatidão a idade da maturidade sexual, os dados indicam que fêmeas alcancem o tamanho mínimo da maturidade sexual por volta do final do seu primeiro ano, enquanto machos atingiriam a maturidade um pouco mais cedo. Uma fêmea de *N. ablephara* coletada em novembro de 2013 já com tamanho superior ao da maturidade sexual, continua viva em um terrário no Laboratório de Herpetologia, indicando que a espécie possa viver, no mínimo, dois anos. A maturação ainda no primeiro ano de vida, possibilitando aos indivíduos participar da estação reprodutiva seguinte ao seu nascimento, é dita como maturação precoce (Tinkle *et al.*, 1969).

O padrão reprodutivo observado para as três espécies estudadas é similar ao descrito para as espécies de maturação precoce (Fitch, 1970; Tinkle *et al.*, 1969) e a não ocorrência da correlação do tamanho da fêmea com o tamanho dos ovos e nem com o número de ovos, apresenta a vantagem de que a partir do tamanho mínimo da maturidade sexual, todas as fêmeas apresentam chances similares de produzir ninhadas. Tais características reprodutivas são bastante vantajosas em um ambiente tão imprevisível quanto à Caatinga, ampliando as oportunidades e o sucesso reprodutivo das três espécies na região.

5. Conclusões

O tamanho da maturidade sexual para *Nothobachia ablephara* e *Procellosaurinus tetradactylus* foi bem estipulado, uma vez que várias classes de tamanho foram amostradas ao longo do estudo, mas para *Calyptommatus leiolepis*, houve um problema de amostragem em relação às classes de tamanho das fêmeas, sendo o tamanho da maturidade destas possivelmente super-valorizado. As três espécies se enquadram no perfil de maturação precoce, ainda no primeiro ano de vida, permitindo que indivíduos jovens participem do ciclo reprodutivo seguinte ao seu nascimento.

C. leiolepis e *N. ablephara* apresentam dimorfismo sexual com fêmeas maiores do que os machos, possivelmente permitindo melhor acomodação dos ovos na cavidade abdominal e reduzindo o conflito entre gravidez e locomoção. A não ocorrência de dimorfismo sexual na forma da cabeça indica a não ocorrência de confrontos agonísticos entre os machos, fato esperado para as espécies de hábitos fossórios. A não ocorrência de dimorfismo sexual na forma da cabeça de *P. tetradactylus* confronta com as observações realizadas para outras espécies lacertiformes da tribo Gymnophthalmini.

As três espécies apresentam ciclo reprodutivo prolongado, com duração provável ao longo de todo o ano, sem período específico de restrição reprodutiva. As condições de temperatura e umidade do ar não se mostram restritivas à atividade reprodutiva, embora se mostrem associadas aos picos de atividade reprodutiva das fêmeas de *Calyptommatus leiolepis* e *Nothobachia ablephara*.

O volume testicular total dos machos adultos indica que cópula e fertilização sejam simultâneas, não ocorrendo armazenamento de esperma por parte das fêmeas. A fecundidade fixa em dois ovos somada à não correlação significativa do tamanho rostro-cloacal das fêmeas com os comprimentos dos ovos, torna possível que as fêmeas invistam mais energia nos eventos reprodutivos, do que em um crescimento exagerado.

O período de incubação dos ovos das três espécies é similar e relativamente curto (entre um e dois meses), permitindo que os ovos permaneçam menos tempo sujeitos às condições ambientais que podem se tornar inóspitas para seu desenvolvimento.

Os resultados obtidos vão de encontro ao observado para *Vanzosaura multiscutata*, o único outro Gymnophthalmidae da Caatinga, cujo ciclo reprodutivo foi estudado, porém diferem dos observados para populações de *Micrablepharus maximiliani* e *V. rubricauda* de regiões com marcada e previsível sazonalidade de precipitação. Tais dados indicam que, assim como previsto para as espécies neotropicals, a precipitação pode atuar como fator limitante ou de incentivo ao aumento da atividade reprodutiva na tribo Gymnophthalmini, porém o peso de tal condição ambiental varia entre diferentes regiões sujeitas à diferentes regimes de precipitação. Pode-se dizer ainda que os resultados aqui apresentados convergem com a observação geral dos padrões reprodutivos para a família Gymnophthalmidae, na qual a reprodução é prolongada/contínua desde que as condições sejam minimamente favoráveis e/ou constantes ao longo do ano.

Novos estudos mostram-se importantes para ampliar o conhecimento acerca da reprodução dos Gymnophthalmidae, não apenas no que diz respeito à sua diversidade de espécies, mas também na comparação do ciclo reprodutivo de populações de uma mesma espécie sob diferentes condições climáticas. Tais dados se mostram fundamentais para a melhor compreensão do papel da filogenia e das condições ambientais na evolução dos padrões reprodutivos da família, assim como para desmistificar a sazonalidade reprodutiva de espécies tropicais em regiões sem precipitação constante.

CAPÍTULO 2

Caracterização dos compostos químicos presentes nos poros pré-anais e em secreções cloacais de *Nothobachia ablephara* e *Calyptommatus leiolepis*

1. Introdução

A grande maioria dos estudos teóricos e empíricos sobre a comunicação entre organismos envolve estímulos visuais e auditivos (Symons & Elgar, 2008). A comunicação química (olfativa) ocorre por todo o reino animal (Hemptinne *et al.*, 2001; Mason & Parker, 2010; Martín & López, 2013; Martín & López, 2015; Scott *et al.*, 2013; Symons & Elgar, 2008) e é mediada por substâncias representadas por diversas classes químicas agrupadas sob o nome de semioquímicos (Martín & López, 2011; Mason & Parker, 2010). Há diferenças marcantes entre estes estímulos: sinais visuais e auditivos são mais facilmente observados e analisados, não enfrentando os mesmos problemas metodológicos dos sinais químicos (Symonds & Elgar, 2008), porém em relação aos próprios organismos, os sinais visuais e auditivos exigem determinadas condições ambientais para que sejam percebidos por outros indivíduos (como, por exemplo, a presença de luz para percepção de sinais visuais), além de apresentarem curta duração (Martín & López, 2012).

Feromônios representam a classe mais bem investigada de semioquímicos (Martín & López, 2005b; Mason & Parker, 2010). São sinais químicos produzidos por um organismo que, mesmo em pequenas quantidades, estimulam resposta comportamental e/ou fisiológica em coespecíficos, podem ser representados por um único composto químico (tipicamente de invertebrados) ou por uma complexa mistura (tipicamente de vertebrados) (Martín & López, 2005b; Symonds & Elgar, 2008). Há uma ampla variedade de trabalhos envolvendo a utilização dos feromônios como componentes de extrema importância na comunicação de diferentes táxons,

incluindo suas variadas funções (Khannoon *et al.*, 2013; Martín & López, 2012; Martín & López, 2015; Symonds & Elgar, 2008), enquanto os estudos sobre a caracterização qualitativa e quantitativa dos compostos químicos aparecem em menor número (Labra *et al.*, 2002; López & Martín, 2005a; Pellitteri-Rosa *et al.*, 2014). Entre as variadas funções dos feromônios, as mais citadas e investigadas na literatura sobre o tema são: atrair coespecíficos para cópula, avisar sobre perigo, reconhecimento individual (de si mesmo e de coespecíficos), busca por alimento (seja seguindo o rastro de presas ou seguindo o rastro de coespecíficos bem alimentados), demarcar território e fornecer informações sobre condições físicas e *status* social (Cooper & Hartdegen, 1999; Cooper & Pérez-Mellado, 2001; Escobar *et al.*, 2001; Greene *et al.*, 2001; Khannoon *et al.*, 2013; Labra *et al.*, 2001; Martín & López, 2013; Martín & López, 2015; Mason & Parker, 2010; Scott *et al.*, 2013; Symonds & Elgar, 2008).

Além destas funções, os feromônios apresentam outras características que são de interesse para estudos evolutivos. Assim como qualquer outro aspecto de um organismo, os ferormônios estão sob forças seletivas natural e sexual e apresentam um importante papel nos processos de isolamento reprodutivo pré-zigótico e especiação (Martín & López, 2005b; Symonds & Elgar, 2008). A evolução dos feromônios pode ocorrer de duas maneiras distintas: qualitativa, com a perda ou ganho de compostos, gerando mudanças radicais entre a composição química de populações/espécies ou quantitativa, através do processo gradual de pequenas alterações nas concentrações de cada um dos componentes (Symonds & Elgar, 2008), esta última parece ser a mais comum entre os trabalhos já publicados (Alberts, 1990; Escobar *et al.*, 2001; Khannonn *et al.*, 2013; López & Martín, 2005b; Martín *et al.*, 2011). A análise da composição química das secreções podem ajudar na elucidação de relações filogenéticas, como foi demonstrado para lagartos da família Lacertidae (Gabirot *et al.*, 2012).

Na ordem Squamata a comunicação química é bastante utilizada e desempenha um papel essencial na reprodução, permitindo que alguns lagartos sejam capazes de identificar o sexo, status social e condições físicas de outros indivíduos da mesma espécie com base apenas nesses sinais

(Martín & López, 2000). Os sinais químicos podem ser produzidos por órgãos específicos, que se apresentam na forma de glândulas exócrinas de posição pré-anal e/ou femoral, ou secretadas juntamente com excretas do corpo, sejam epidérmicos ou mesmo fezes e urinas (Ahern & Downing, 1974; Escobar *et al.*, 2001; Martín & López, 2005b; Martín & López, 2015;). A língua age como um sistema de amostragem dos sinais químicos presentes no meio encaminhando-os para o órgão de Jacobson (ou vomeronasal) e daí para o cérebro (Mason & Parker, 2010; Pough *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2013). A maior parte dos estudos em Squamata envolve a análise das secreções glandulares femorais e pré-cloacais (Alberts, 1990; Escobar *et al.*, 2001; Gabirot *et al.*, 2012; Khannoon *et al.*, 2013; Labra *et al.*, 2001; López & Martín, 2005a; Martín & López, 2012; Martín *et al.*, 2013; Pellitteri-Rosa *et al.*, 2014), sendo menos numerosos os estudos sobre as secreções epidérmicas (Ahern & Downing, 1974; Burken *et al.*, 1985; Mason *et al.*, 1987; Weldon & Bagnall, 1987) e pelotas fecais (Kummrow *et al.*, 2010; Labra *et al.*, 2002; Martín & López, 2013; Scott *et al.*, 2013).

Dos trabalhos publicados sobre comunicação química, apenas 1% refere-se aos Squamata, porcentagem similar a de estudos realizados com Amphibia, mas bastante inferior aos dados referentes à Mammalia (8%) (Symonds & Elgar, 2008). Os trabalhos em Squamata concentram-se em Serpentes, sendo os trabalhos realizados com lagartos reduzidos a algumas espécies pertencentes a poucas famílias, apenas nove das 36 reconhecidas no trabalho de Pyron e colaboradores (2013): Cordylidae, Eublepharidae, Gekkonidae, Gerrhosauridae, Iguanidae, Lacertidae (maior número de trabalhos), Phrynosomatidae, Scincidae e Tropiduridae (Labra *et al.*, 2002; López & Martín, 2005a). Há a necessidade de que dados sejam levantados para maior parcela da diversidade de Squamata, permitindo sua utilização para comparações adequadas sobre o papel da comunicação química na compreensão da filogenia e da ecologia (Alberts, 1990).

Em relação aos lagartos da família Gymnophthalmidae nada é conhecido acerca da composição e do significado funcional dos ferormônios produzidos. Os dados filogeneticamente mais próximos aos lagartos da família Gymnophthalmidae concentram-se em um único estudo realizado com uma

espécie (*Tupinambis merianae*) (Martín *et al.*, 2011) da família Teiidae, irmã da Gymnophthalmidae (Pyron *et al.*, 2013). *T. merianae* apresentou um padrão diferente do observado para as demais espécies que já haviam sido investigadas, envolvendo a ausência de colesterol em suas secreções femorais.

Dentro deste contexto de reconhecimento da importância da comunicação química para os Squamata, principalmente para aqueles de hábitos fossoriais, para os quais a comunicação química pode ser a única forma de detectar coespecíficos e discriminar o sexo (López & Martín, 2005a), e o papel desempenhado na reprodução, comportamento social e no processo de especiação, o presente trabalho tem como principal objetivo caracterizar os compostos químicos presentes em secreções de glândulas pré-anais de machos de *Calyptommatus leiolepis* e *Nothobachia ablephara*, assim como os compostos presentes em esfregaços cloacais para ambos os sexos. A comparação entre a composição das duas espécies também será realizada, buscando por compostos que sejam espécie-específicos e/ou que estejam relacionados com as condições ambientais nas quais essas espécies se encontram.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção das amostras

Devido ao caráter experimental desta parte do projeto, alterações metodológicas foram realizadas conforme as análises eram feitas e ajustes se mostravam necessários para a melhoria dos resultados obtidos. Todas as amostras foram obtidas de exemplares adultos e em vida, a quase totalidade dos indivíduos amostrados foi devolvida ao local de coleta após a remoção das amostras.

Secreções cloacais

Para a obtenção das secreções cloacais foram realizados esfregaços cloacais levantando-se a placa anal com o auxílio de hastes flexíveis com ponta de algodão estéril (*swabs*). Os indivíduos adultos foram imobilizados com o ventre voltado para cima, os *swabs* removidos da embalagem e esfregados contra a abertura cloacal. Como os indivíduos evacuavam no momento da retirada da amostra e as fezes fazem parte da amostra, uma vez que são fontes conhecidas de feromônios (Ahern & Downing, 1974; Escobar *et al.*, 2001; Martín & López, 2005b; Martín & López, 2015), as mesmas não foram descartadas. Essa metodologia foi desenvolvida pela impossibilidade de se obter pelotas fecais diretamente do solo como é feito para outras espécies de lagartos, uma vez que *Calyptommatus leiolepis* e *Nothobachia ablephara* apresentam hábito fossorial.

Os *swabs* com esfregaços cloacais foram colocados em tubos de vidro com solvente e armazenados a – 20°C até o momento das análises. Após as duas primeiras amostragens, a vidraria utilizada foi alterada para uma de menor volume, permitindo a utilização de menor quantidade de solvente para cobrir as extremidades de algodão dos *swabs*.

Secreções dos poros pré-anais

Em *C. leiolepis* e *N. ablephara* apenas os machos possuem poros pré-anais, quatro na primeira espécie e seis na segunda (**Figura 29**). Os poros são estruturas epidérmicas conectadas às glândulas que produzem secreção holócrina e lipofílica que se apresenta externamente na forma sólida (Alberts, 1990; Escobar *et al.*, 2001; Khannoon *et al.*, 2013). A obtenção da secreção pré-anal consiste na remoção da estrutura sólida e de coloração amarela, também chamada de *plug* na literatura (Alberts, 1990).

Figura 29 – Poros pré-anais e hemipênis dos machos de (A) *Calyptommatus leiolepis* e (B) *Nothobachia ablephara*. As pontas das setas indicam cada um dos poros.

Para a remoção dos *plugs*, machos adultos foram imobilizados com a face ventral voltada para cima e com o auxílio de uma agulha estéril todos os *plugs* de cada indivíduo foram removidos e imediatamente colocados em um *vial* de vidro de 1,5 ml com solvente e permaneceram armazenados a -20°C até o momento das análises (**Figura 30**). Pelo tamanho reduzido dos indivíduos e dos *plugs*, que ocorrem em pequeno número quando comparado com o das espécies que aparecem na literatura (Labra *et al.*, 2001; Martín & López, 2013; Martín & López, 2015, entre outros), os indivíduos não foram analisados individualmente, mas sim foram formados agrupamentos com os *plugs* de diferentes indivíduos.

Os *vials* possuem tampas com um lado de silicone e outro de *teflon* que permanece voltado para o lado da amostra, evitando contaminantes de plástico. Em cada amostragem a mesma agulha de insulina foi utilizada para uma única espécie, sendo trocada em caso de contato com a mão ou qualquer outra superfície. Nas últimas duas amostras foram utilizados *inserts* de 250 μl

para redução do volume de solvente na tentativa de aumentar a concentração dos compostos químicos no solvente.

Figura 30 – Material utilizado para armazenamento dos *plugs*: a esquerda, *vials* de 1,5 ml e a direita, *insert* de 250 µl.

Tanto as análises de secreções cloacais, quanto das glândulas femorais ou pré-cloacais presentes na literatura identificaram a ocorrência de compostos lipofílicos e utilizaram hexano como solvente, uma vez que este é apolar permitindo a detecção desta classe de compostos. Neste trabalho também utilizamos hexano como solvente, mas a quantidade utilizada variou de acordo com o aperfeiçoamento da metodologia.

Amostras

Dezembro de 2013:

- 4 ml de hexano nos esfregaços cloacais e 0,5 ml de hexano nos poros pré-anais.
- *N. ablephara*:
 - Esfregaços: duas amostras, uma de fêmeas e uma de machos, com dez indivíduos em cada uma.
 - Poros pré-anais: uma amostra com os poros de dez indivíduos.
- *C. leioleipsis*:

- Esfregaços: seis amostras, três de fêmeas e três de machos, com dez indivíduos em cada uma.
- Poros pré-anais: três amostras com dez indivíduos em cada uma.

Abril de 2014:

- 4 ml de hexano nos esfregaços cloacais e 0,5 ml de hexano nos poros pré-anais.
- Antes de retirar as amostras, os indivíduos tiveram o ventre lavado com água destilada.
- *N. ablephara*:
 - Esfregaços: quatro amostras, duas de fêmeas e duas de machos, com cinco indivíduos em cada uma.
 - Poros pré-anais: duas amostras com os poros de cinco indivíduos em cada uma.
- *C. leiolepis*:
 - Esfregaços: seis amostras, três de fêmeas e três de machos, com dez indivíduos em cada uma.
 - Poros pré-anais: três amostras com dez indivíduos em cada uma.

Setembro de 2014:

- 2 ml de hexano nos esfregaços cloacais e 0,5 ml de hexano nos poros pré-anais.
- *N. ablephara*:
 - Esfregaços: três amostras, duas de fêmeas e uma de machos, com quatro indivíduos em cada uma.

- Poros pré-anais: uma amostra com quatro indivíduos.
- *C. leirolepis*:
 - Esfregaços: 14 amostras, sete de fêmeas e sete de machos, cada uma com quatro indivíduos.
 - Poros pré-anais: sete amostras com quatro indivíduos em cada uma.

Janeiro de 2015:

- 2 ml de hexano nos esfregaços cloacais e 100 µl ou 10 µl de hexano nos poros pré-anais.
- *N. ablephara*:
 - Esfregaços: uma amostra de fêmeas e uma de machos, cada uma com três indivíduos.
 - Poros pré-anais: uma amostra com quatro indivíduos (100 µl).
- *C. leirolepis*:
 - Esfregaços: uma amostra de fêmeas e uma de machos, cada uma com três indivíduos.
 - Poros pré-anais: uma amostra com cinco indivíduos (100 µl).

2.2. Cromatografia gasosa e Espectrometria de Massas

As amostras foram analisadas utilizando o equipamento de cromatografia gasosa (CG 6850) e de espectrometria de massas (MS 5975) ambos da Agilent Technologies e pertencentes ao Laboratório de Fitoquímica, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob os cuidados da prof^a Claudia Furlan e da técnica Aline Cruz.

De cada amostra, foi injetada uma alíquota de 1 µl (secreção + hexano) em modo *splitless* utilizando hélio como gás de arraste a 30 cm/s. A temperatura de injeção foi de 250 °C e a programação da rampa de temperatura foi da seguinte forma: 50 °C durante 5 minutos, depois ampliada para 270 °C a uma taxa de 10 °C/min e, finalmente, uma isotérmica de 315 °C por 10 minutos (Gabirot *et al.*, 2012). A ionização foi realizada por impacto de elétrons (70 eV) a 250 °C (Gabirot *et al.*, 2012; Khanon *et al.*, 2013).

Impurezas do solvente e/ou dos *vials* de controle não foram incluídos nos resultados e nas análises (Runemark *et al.*, 2011), possíveis contaminantes não foram incluídos nas análises, mas fazem parte da discussão (Martín *et al.*, 2011). Os compostos foram identificados através do programa Chemstation da Agilent Technologies e comparados através de suas porcentagens relativas.

2.3. Análises qualitativas e estatísticas

Esfregaços cloacais

Os melhores resultados foram obtidos da análise de setembro de 2014 na qual dispúnhamos de 14 amostras de *Calyptommatus* (sete para cada sexo), uma amostra de machos e duas de fêmeas de *Nothobachia*.

Para *C. leirolepis* primeiro foi feita a identificação do total de compostos observados em machos e fêmeas e depois comparados quais compostos eram exclusivos de cada um dos sexos, quais ocorriam em todas as amostras e quais não eram exclusivos de um sexo, mas que não ocorriam em todas as amostras da espécie. Posteriormente foi realizada a comparação intrassexual das porcentagens relativas de cada composto, tal comparação foi realizada através da ANOVA, quando respeitadas às premissas de normalidade e equivalência de variâncias, quando não foi utilizado seu equivalente não paramétrico (Zar, 2010). Por fim, foi realizada a comparação intersexual usando as 14 amostras e seguindo a mesma metodologia da comparação anterior.

Para *N. ablephara* não foi possível realizar testes estatísticos, mas a primeira etapa foi similar à realizada para *C. leiolepis*, através do levantamento qualitativo dos compostos químicos detectados para a espécie. Entre as fêmeas de *Nothobachia* as porcentagens relativas foram comparadas dividindo a maior porcentagem pela menor, tendo assim um padrão de quantas vezes a porcentagem relativa de uma das amostras era maior que a da outra. O mesmo foi realizado na comparação intersexual, procurando definir para quais compostos químicos fêmeas ou machos apresentam porcentagens maiores e quais os compostos nos quais as porcentagens eram similares.

A mesma metodologia utilizada nas comparações para *N. ablephara* foi utilizada para comparar os resultados obtidos entre as espécies.

Poros pré-cloacais

Os resultados foram obtidos das análises de janeiro de 2015, na qual havia apenas uma amostra para cada espécie, sendo assim as comparações foram apenas qualitativas. Primeiro foi verificado o total dos componentes detectados nas amostras, depois realizada a comparação de ocorrência entre as duas espécies e por fim os compostos de ocorrência nas duas espécies foram comparados na tentativa de indicar quais compostos possivelmente ocorrem em maior porcentagem em cada uma das espécies e quais ocorrem em quantidades similares.

3. Resultados

3.1. Dificuldades metodológicas

A primeira e a segunda amostra (de agosto e de dezembro de 2013) apresentaram elevadas quantidades de sílica (contaminante) com picos bastante intensos nos cromatogramas, mascarando os demais picos e impossibilitando a identificação confiável da maioria dos compostos. Contaminantes de sílica foram identificados em 12 tempos de retenção distintos e apareceram em maior quantidade nas amostras de poros pré-cloacais. Embora sem identificação confiável, esta primeira análise de cromatografia gasosa revelou a presença de diferentes alcanos em grandes porcentagens e de alguns ácidos graxos, além de compostos que não puderam ser identificados em nenhuma classe.

A amostra de abril de 2014 apresentou poucos picos e de baixíssimas intensidades, não permitindo a identificação dos compostos químicos. Essa amostra representa os indivíduos que foram banhados com água destilada antes da remoção das secreções.

3.2. Esfregaços cloacais

Os resultados correspondem as amostras de setembro de 2014 sendo sete amostras de fêmeas de *Calyptommatatus leiolepis*, sete de machos de *C. leiolepis*, duas de fêmeas de *Nothobachia ablephara* e uma de macho de *N. ablephara*.

Ao total foram observados 25 compostos químicos: 11 compostos não puderam ser identificados, 11 alcanos de cadeias carbônicas longas, um esteroide (pregnane) e dois ácidos graxos (hexadecanóico e octanodecanóico). Os compostos não identificados não puderam ser agrupados em nenhuma categoria, pois a biblioteca e os espectros de massa não ofereceram porcentagem confiável durante a identificação.

3.2.1. *Calyptommatus leiolepis*

Dos 25 compostos identificados, 18 estão presentes em todas as amostras de *Calyptommatus*, independente do sexo, três encontram-se exclusivamente nos machos, um é observado quase exclusivamente em fêmeas e dois são encontrados na grande maioria das amostras e um é encontrado aleatoriamente em machos e fêmeas, mas em poucas amostras.

Um composto não identificado (tempo de retenção 26,29 minutos) foi observado em seis das sete amostras de fêmeas e apenas em uma amostra de machos e a média nas fêmeas foi de 0,117%. O composto não identificado de tempo de retenção de 33,7 minutos foi observado em todas as amostras de machos com porcentagem média de 0,175% e o composto não identificado com tempo de retenção de 22,94 minutos foi observado em quatro das sete amostras, sendo a média dos indivíduos que o possuem igual a 0,103%. As **Tabelas 11 e 12** apresentam as porcentagens relativas de todos os compostos observados separados por sexo.

Não foram observadas diferenças entre as porcentagens relativas de cada um dos componentes químicos entre as sete amostras de esfregaços cloacais das fêmeas (Kruskal-Wallis, $p = 0,42$). As maiores porcentagens são observadas para alcanos, principalmente os com cadeias entre 24 e 28 carbonos.

Não foram observadas diferenças entre as porcentagens relativas de cada um dos componentes químicos entre as sete amostras de esfregaços cloacais dos machos (Kruskal-Wallis, $p = 0,42$). As maiores porcentagens também são observadas para alcanos, principalmente os com cadeias entre 24 e 28 carbonos.

Tabela 11 – Porcentagens relativas de todos os compostos identificados em cada uma das sete amostras de esfregaços cloacais de fêmeas de *Calyptommatatus leiolepis*. O composto químico “exclusivo” de fêmeas encontra-se em negrito. RT = tempo de retenção em minutos.

RT médio	Identificação	1	2	3	4	5	6	7
19,93	alcano (C16)	-	0,045	-	0,101	0,036	0,051	0,143
22,82	NI	0,075	0,067	0,071	-	-	-	-
25,15	alcano (C21)	0,032	0,027	0,037	0,113	0,027	0,065	0,172
25,64	NI	0,164	0,197	0,179	0,167	0,225	0,229	0,191
26,09	Alcano (C22)	1,904	1,869	1,933	1,996	1,883	2,025	2,124
26,30	NI	0,092	0,102	0,063	-	0,177	0,137	0,130
26,43	ácido hexadecanóico	0,198	0,243	0,160	0,225	0,249	0,403	0,406
26,53	pregnane	0,254	0,287	0,252	0,221	0,399	0,353	0,351
26,94	alcano (C23)	7,045	7,264	7,110	7,029	7,136	7,102	7,263
27,23	NI	0,312	0,371	0,330	0,355	0,393	0,353	0,387
27,51	NI	-	0,103	-	0,094	0,084	-	0,115
27,68	NI	0,129	0,162	0,149	0,151	0,170	0,198	0,176
27,78	alcano (C24)	12,456	12,956	12,559	12,466	12,765	12,935	13,054
28,14	ácido octadecanóico	0,211	0,234	0,217	0,213	0,281	0,329	0,307
28,61	alcano (C25)	16,257	16,606	16,340	16,213	16,998	16,792	16,532
29,51	alcano (C26)	16,342	16,373	16,449	16,311	16,846	16,668	16,456
30,34	alcano (C27)	16,342	16,414	16,559	16,585	16,737	16,485	16,355
31,12	alcano (C28)	12,202	11,789	12,299	12,427	11,667	12,144	11,847
31,75	alcano (C29)	8,277	7,774	8,288	8,478	7,832	8,164	7,978
32,40	alcano (C30)	3,234	2,753	3,183	3,310	2,849	3,030	3,128
33,00	NI	0,915	0,720	0,932	1,036	0,770	0,916	1,098
35,87	NI	2,122	2,385	1,821	1,492	1,236	0,986	0,703
38,10	NI	1,231	1,107	1,022	0,894	1,021	0,636	0,479

Tabela 12 – Porcentagens relativas de todos os compostos identificados em cada uma das sete amostras de esfregaços cloacais de machos de *Calyptommatus leiolepis*. Os compostos químicos “exclusivos” de machos encontram-se em negrito. RT = tempo de retenção em minutos.

RT médio	Identificação	1	2	3	4	5	6	7
19,93	alcano (C16)	0,072	0,045	0,178	0,049	0,064	0,069	0,192
22,82	NI	0,115	0,104	-	0,106	-	0,096	-
22,94	NI	0,110	0,111	-	0,104	-	0,089	-
25,15	alcano (C21)	0,063	0,102	0,181	0,055	0,094	0,045	0,215
25,64	NI	0,156	0,197	0,157	0,349	0,151	0,174	0,301
26,09	alcano (C22)	1,759	2,152	2,028	1,920	2,137	1,827	2,382
26,30	NI	-	-	-	0,282	-	-	-
26,43	ácido hexadecanóico	0,520	0,631	0,527	1,044	0,224	0,413	0,766
26,53	pregnane	0,247	0,353	0,201	0,621	0,252	0,184	0,459
26,94	alcano (C23)	6,539	7,080	6,754	6,983	7,298	6,707	7,162
27,23	NI	0,309	0,380	0,347	0,587	0,316	0,294	0,469
27,51	NI	-	0,116	-	0,303	-	-	-
27,68	NI	0,130	0,165	0,162	0,304	0,137	0,121	0,219
27,78	alcano (C24)	11,617	11,951	11,699	11,726	12,632	11,766	12,247
28,14	ácido octadecanóico	0,273	0,163	0,347	0,524	0,205	0,266	0,366
28,61	alcano (C25)	15,313	15,296	15,235	15,166	16,219	15,539	15,668
29,51	alcano (C26)	15,653	15,240	15,421	15,116	16,271	15,739	15,401
30,34	alcano (C27)	15,869	15,080	15,451	15,320	16,144	16,118	15,238
31,12	alcano (C28)	11,842	11,376	11,312	11,543	12,015	12,165	11,385
31,75	alcano (C29)	8,375	8,290	8,191	8,121	8,193	8,530	8,086
32,40	alcano (C30)	3,425	3,660	1,635	3,263	3,204	3,438	3,479
33,00	NI	1,369	1,376	-	1,133	0,936	1,325	1,436
33,70	NI	0,194	0,148	0,355	0,096	0,073	0,101	0,263
35,87	NI	3,809	3,478	3,308	3,355	2,043	3,171	1,939
38,10	NI	2,164	2,030	1,995	1,839	1,392	1,740	1,411

Na comparação intersexual foram observadas diferenças entre as porcentagens relativas de ácido hexadecanóico ($p = 0,01$), alcanos com cadeias entre 24 e 28 carbonos ($p < 0,04$) e dois compostos não identificados ($p < 0,001$) (RT = 35,87 minutos e RT = 38,1 minutos). Fêmeas apresentaram maior porcentagem para os alcanos, enquanto os machos apresentaram maiores porcentagens para o ácido hexadecanóico e para os dois compostos não identificados. A **Figura 31** apresenta as médias das porcentagens de cada classe de composto para cada um dos sexos.

Figura 31 – Porcentagens relativas aproximadas de cada classe dos compostos químicos identificados, separados por sexo.

3.2.2. *Nothobachia ablephara*

Dos 25 compostos identificados, apenas 22 estão presentes nas amostras de *N. ablephara*. Vinte destes estão presentes em todas as amostras independente do sexo, e dois encontram-se apenas nas amostras de fêmeas. Mesmo nas análises anteriores que apresentaram problemas metodológicos, não foi observada exclusividade nos compostos dos machos de *N. ablephara*.

Um composto não identificado (tempo de retenção 33,7 minutos) foi observado nas duas amostras de fêmeas, mas não na amostra de machos e a média da porcentagem relativa das duas amostras foi de 0,193%. O composto não identificado de tempo de retenção de 22,8 minutos foi observado apenas em uma das amostras de fêmeas e com porcentagem relativa de 0,113%. A **Tabela 13** apresenta as porcentagens relativas de todos os compostos observados separados por sexo.

Pela ocorrência de apenas uma amostra válida de esfregaços cloacais de machos e duas para as fêmeas, não foram realizadas comparações intrassexuais e interssexuais estatísticas, mas apenas qualitativas. As maiores porcentagens em machos e fêmeas são observadas para alcanos, principalmente os com cadeias entre 24 e 28 carbonos.

Entre as fêmeas a maior diferença observada entre as duas amostras é a ocorrência de um composto não identificado com tempo de retenção de 28,82 minutos apenas em uma delas (0,113%). A segunda maior diferença é em relação ao alcano com cadeia de 16 carbonos, com a amostra 1 apresentando porcentagem relativa 2,5 vezes maior do que a observada na amostra 2 (porcentagens de 0,141% e 0,057%). Em dois dos compostos não identificados as diferenças observadas foram de uma amostra com porcentagem relativa aproximadamente duas vezes mais do que na outra (RT = 38,1 minutos, sendo as porcentagens de 0,981% e 1,921%) e outro composto (RT = 33,7 minutos) com porcentagem relativa 1,5 vezes maior do que na outra (porcentagens de 0,230% e 0,157%). Para os demais compostos a maior diferença entre as porcentagens relativas foi de 1,3 vezes maior em uma amostra e a menor de 1,007.

Tabela 13 – Porcentagens relativas de todos os compostos identificados em cada uma das duas amostras de fêmeas e na amostra de machos de *Nothobachia ablephara*. Os compostos químicos “exclusivos” de fêmeas encontram-se em negrito. RT = tempo de retenção em minutos.

RT médio	Identificação	FÊMEAS		MACHOS
		1	2	1
19,93	alcano (C16)	0,141	0,057	0,070
22,82	NI	-	0,113	-
25,15	alcano (C21)	0,173	0,191	0,060
25,64	NI	0,148	0,170	0,138
26,09	alcano (C22)	2,081	2,363	1,709
26,43	ácido hexadecanóico	0,410	0,557	0,313
26,53	pregnane	0,302	0,264	0,220
26,94	alcano (C23)	6,817	6,996	6,877
27,23	NI	0,379	0,323	0,344
27,68	NI	0,133	0,127	0,181
27,78	alcano (C24)	11,628	11,878	12,799
28,14	ácido octadecanóico	0,285	0,283	0,319
28,61	alcano (C25)	14,908	15,018	16,623
29,51	alcano (C26)	15,261	15,188	16,590
30,34	alcano (C27)	15,945	15,185	16,185
31,12	alcano (C28)	11,684	11,841	11,447
31,75	alcano (C29)	8,507	8,337	7,688
32,40	alcano (C30)	3,729	3,880	2,618
33,00	NI	1,598	1,519	0,650
33,70	NI	0,230	0,157	-
35,87	NI	3,465	3,627	3,239
38,10	NI	0,981	1,921	1,914

Na comparação intersexual não foram utilizados os dois compostos que ocorrem exclusivamente nas fêmeas. Machos apresentaram 0,07% do alcano de cadeia com 16 carbonos, valor próximo ao de uma das amostras de fêmeas (0,057%), mas metade do valor observado na outra (0,141%). No composto não identificado de RT = 38,1 minutos, machos apresentaram porcentagem similar ao de uma das amostras de fêmeas (1,914% para os machos e 1,921% para as fêmeas).

Machos apresentam maior quantidade de alcanos com cadeias que variam de 24 a 27 carbonos, mas a maior diferença foi de machos com porcentagem relativas 1,11 vezes maior que das fêmeas (alcano com 25

carbonos). Fêmeas apresentam maior porcentagem de ácido hexadecanóico, enquanto machos apresentam maior porcentagem do ácido octadecanóico. As maiores diferenças foram observadas no alcano com cadeia com 16 carbonos (porcentagem das fêmeas é três vezes maior que a dos machos) e no composto não identificado de tempo de retenção igual a 33 minutos (porcentagem das fêmeas é aproximadamente 2,5 vezes maior que a dos machos).

Figura 31 – Porcentagens relativas aproximadas de cada classe dos compostos químicos identificados, separados por sexo.

3.2.3. Comparações interespecíficas

Dos 25 compostos identificados, as fêmeas de *Calyptommatus* apresentam 24 e as de *Nothobachia* 21 compostos. A **Tabela 14** apresenta as porcentagens médias para cada um dos compostos das fêmeas separadas por espécies.

Tabela 14 – Porcentagens relativas médias de todos os compostos identificados nas amostras de fêmeas de *Calyptommatus leiolepis* e *Nothobachia ablephara*. Os compostos químicos “exclusivos” de fêmeas de *C. leiolepis* encontram-se em negrito. RT = tempo de retenção em minutos.

RT médio	Identificação	<i>Calyptommatus</i>	<i>Nothobachia</i>
19,93	alcano (C16)	0,143	0,141
22,82	NI	0,075	-
25,15	alcano (C21)	0,102	0,173
25,64	NI	0,178	0,148
26,09	alcano (C22)	2,014	2,081
26,30	NI	0,111	-
	ácido		
26,43	hexadecanóico	0,302	0,410
26,53	pregnane	0,303	0,302
26,94	alcano (C23)	7,154	6,817
27,23	NI	0,350	0,379
27,51	NI	0,115	-
27,68	NI	0,153	0,133
27,78	alcano (C24)	12,755	11,628
28,14	ácido octadecanóico	0,259	0,285
28,61	alcano (C25)	16,395	14,908
29,51	alcano (C26)	16,399	15,261
30,34	alcano (C27)	16,349	15,945
31,12	alcano (C28)	12,025	11,684
31,75	alcano (C29)	8,128	8,507
32,40	alcano (C30)	3,181	3,729
33,00	NI	1,007	1,598
33,70	NI	-	0,230
35,87	NI	1,413	3,465
38,10	NI	0,855	0,981

Fêmeas de *Calyptommatus* apresentam três compostos não identificados que fêmeas de *Nothobachia* não possuem. Em contrapartida, o único composto que fêmeas de *N. ablephara* apresentam e as de *C. leiolepis* não, é o não identificado com RT = 33,7 minutos que é observado apenas nos machos de *C. leiolepis*, mas não em machos de *N. ablephara*. As fêmeas de *C. leiolepis* apresentam maior porcentagem relativa nos alcanos com cadeias entre 23 e 28 carbonos, mas diferenças mais visíveis são observadas em compostos nos quais fêmeas de *N. ablephara* apresentam maior porcentagem relativa (dois compostos não identificados de tempos de retenção iguais a 33 e 35,87 minutos). As fêmeas de *Nothobachia* apresentaram maior quantidade dos dois ácidos e as porcentagens de pregnane são basicamente idênticas nas duas espécies.

Dos 25 compostos identificados, os machos de *Calyptommatus* apresentam 23 e os de *Nothobachia* 20 compostos. A **Tabela 15** apresenta as porcentagens médias para cada um dos compostos dos machos separados por espécies.

Os machos de *C. leiolepis* apresentaram três compostos não identificados (RT = 22,82 minutos, 22,94 minutos e 33,7 minutos) que machos de *N. ablephara* não possuem. Não há compostos químicos que machos de *Nothobachia* apresentem, mas que não estejam presentes nos machos de *C. leiolepis*. Alcanos de cadeias entre 24 e 27 carbonos apresentam maiores porcentagens relativas em machos de *Nothobachia* do que em machos de *Calyptommatus*. As porcentagens de ácido octadecanóico são bastante similares nos machos das duas espécies, mas *C. leiolepis* apresentou o dobro de ácido hexadecanóico do que machos de *N. ablephara*. Machos de *Calyptommatus* apresentam maior porcentagem de pregnane.

Tabela 15 – Porcentagens relativas médias de todos os compostos identificados nas amostras de machos de *Calypptommatius leiolepis* e *Nothobachia ablephara*. Os compostos químicos “exclusivos” de machos de *C. leiolepis* encontram-se em negrito. RT = tempo de retenção em minutos.

RT médio	Identificação	<i>Calyptommatius</i>	<i>Nothobachia</i>
19,93	alcano (C16)	0,132	0,070
22,82	NI	0,115	-
22,94	NI	0,110	-
25,15	alcano (C21)	0,139	0,060
25,64	NI	0,229	0,138
26,09	alcano (C22)	2,071	1,709
26,43	ácido hexadecanóico	0,643	0,313
26,53	pregnane	0,353	0,220
26,94	alcano (C23)	6,851	6,877
27,23	NI	0,389	0,344
27,68	NI	0,175	0,181
27,78	alcano (C24)	11,932	12,799
28,14	ácido octadecanóico	0,320	0,319
28,61	alcano (C25)	15,491	16,623
29,51	alcano (C26)	15,527	16,590
30,34	alcano (C27)	15,554	16,185
31,12	alcano (C28)	11,614	11,447
31,75	alcano (C29)	8,231	7,688
32,40	alcano (C30)	3,452	2,618
33,00	NI	1,403	0,650
33,70	NI	0,229	-
35,87	NI	2,874	3,239
38,10	NI	1,788	1,914

3.3. Poros pré-cloacais

Foram identificados 28 compostos químicos nas secreções pré-cloacais, dois ácidos graxos, três derivados de ácidos graxos agrupados como oleamidas, sete derivados de alcanos e 16 compostos não identificados. Não foram observados esteroides.

Cada uma das espécies apresentou um composto químico exclusivo, totalizando 27 compostos em cada espécie. A **Tabela 16** apresenta as porcentagens relativas de todos os compostos químicos detectados durante a análise cromatográfica separados para cada uma das espécies. Os dois compostos exclusivos não foram identificados, o de *C. leiolepis* tem RT = 13,98 minutos e o de *N. ablephara* RT = 25,80 minutos.

Entre os compostos observados nas duas espécies a diferença mais significativa foi entre a porcentagem da oleamida com tempo de retenção de 28,07 minutos. Tal composto corresponde a 22,75% da secreção de *Calyptommatus*, sendo o composto mais abundante na espécie, enquanto representa apenas 3,73% da secreção pré-cloacal de *Nothobachia*. Para machos de *Nothobachia* o composto que aparece em maior porcentagem é o derivado de alcano (15,07%) com RT = 12,65 minutos, seguido por dois compostos não identificados (RT = 13,08 minutos e 13,28 minutos), sendo os demais compostos observados em porcentagens inferiores aos 5%. Em *C. leiolepis*, além da oleamida com 22,75%, há um derivado de alcano (RT = 12,65 minutos) e um composto não identificado (RT = 13,08 minutos) com porcentagens superiores aos 10%, sendo os demais compostos observados em porcentagens próximas ou inferiores aos 5%.

Em relação aos dois ácidos graxos, a porcentagem do ácido hexadecanóico é similar nas duas espécies, sendo sutilmente superior em *Nothobachia*, enquanto a porcentagem do ácido graxo não identificado (RT = 25,6 minutos) é aproximadamente quatro vezes maior em *C. leiolepis* do que em *N. ablephara*.

Tabela 16 – Porcentagens relativas de todos os compostos identificados nas amostras de secreções pré-cloacais de machos de *Calypotommatus leiolepis* e *Nothobachia ablephara*. RT = tempo de retenção em minutos.

RT médio	identificação	<i>Calypotommatus</i>	<i>Nothobachia</i>
12,18	NI	1,083	1,42
12,26	derivado de alcano	3,154	4,312
12,34	NI	1,344	1,902
12,65	derivado de alcano	11,103	15,07
12,82	derivado de alcano	4,524	6,252
12,93	derivado de alcano	2,973	4,068
13,08	NI	10,341	13,785
13,18	NI	1,247	1,729
13,28	NI	7,972	10,885
13,40	derivado de alcano	3,739	5,044
13,47	derivado de alcano	5,162	6,806
13,72	derivado de alcano	3,444	4,535
13,78	NI	2,332	3,58
13,84	NI	2,008	2,729
13,91	NI	2,049	2,831
13,98	NI	-	1,805
14,38	NI	1,148	1,804
14,46	NI	1,154	1,554
14,62	NI	0,7	0,977
14,67	NI	0,477	0,676
23,82	NI	0,473	0,372
24,04	ácido hexadecanóico	0,462	0,524
25,60	ácido graxo NI	3,133	0,786
25,80	NI	0,537	-
26,47	oleamida	2,341	1,017
28,07	oleamida	22,754	3,728
28,25	oleamida	2,809	0,654
28,34	NI	0,854	0,332

4. Discussão

C. leiolepis e *N. ablephara* são duas espécies cujo hábito de vida impõe restrições similares às dos Amphisbaenidae, tornando a comunicação química um potencial fator essencial na ecologia e no comportamento reprodutivo dessas espécies, uma vez que os sinais visuais são basicamente inúteis sob a superfície (Martín & López, 2011; Scott *et al.*, 2013). Embora a caracterização química dos feromônios de répteis represente um campo de estudo ainda muito recente e apresentem enormes lacunas de conhecimento quando comparada com outros grupos de organismos (Martín & López, 2001; Symonds & Elgar, 2008), não há dúvidas sobre a importância das glândulas femorais e pré-cloacais, assim como da cloaca, na produção e liberação dos feromônios (Alberts, 1990; Escobar *et al.*, 2001).

A grande maioria dos estudos sobre a comunicação química em répteis envolve a detecção de compostos lipídicos e lipofílicos presentes nas secreções epidérmicas, cloacais e glandulares (femorais e pré-cloacais), principalmente dos machos (Alberts, 1990; Ahern & Downing, 1974; Burken *et al.*, 1985; Martín *et al.*, 2013; Weldon & Bagnall, 1987). As classes de compostos observados com maior frequência e em maior quantidade são: esteroides e ácidos graxos (Labra *et al.*, 2001; López & Martín, 2005b; Mason *et al.*, 1987, entre outros). Esses compostos apresentam características apolares, justificando a escolha do hexano como solvente das análises cromatográficas.

Entre os problemas metodológicos enfrentados durante este trabalho nos deparamos com contaminações de sílica em algumas amostras, tendo sido esta mais significativa em nossa primeira análise. A sílica é um componente que aparece em grandes quantidades no solo, sendo sua contaminação um provável reflexo do hábito fossorial das espécies. Sabe-se que anfisbênas e alguns lagartos deixam passivamente suas secreções glandulares no solo por atrito dos *plugs* durante a locomoção (Imparato *et al.*, 2007; Martín & López, 2011), provavelmente *Calyptommatus* e *Nothobachia* utilizam a mesma estratégia, tornando natural tal contaminação. Não foi possível determinar uma causa razoável para a perda dos compostos químicos nas amostras nas quais

os animais foram banhados com água destilada, uma vez que a água é um solvente polar. Kummrow e colaboradores (2010) ressaltam a dificuldade de se realizar análises químicas com amostras fecais de répteis pequenos, pois há dificuldade em se obter uma quantidade adequada de material e sabemos que a produção de secreções glandulares pode apresentar ampla variação ao longo do ano (Alberts, 1990; Martín *et al.*, 2013; Mason *et al.*, 1987; Runemark *et al.*, 2011). Em relação à comparação das porcentagens de cada um dos compostos, deve-se considerar que, embora as porcentagens de cada composto sejam relativas ao total da amostra, o número de indivíduos em cada uma delas pode influenciar os resultados, uma vez que possíveis compostos com ampla variação individual podem ocorrer em maior porcentagem relativa naquelas amostras com maior número de indivíduos.

Entre as amostras de esfregaços cloacais foram detectados 25 compostos químicos distintos. As diferenças de ocorrência foram observadas em um pequeno número de compostos que não puderam ser identificados por seus espectros de massa, mas as fêmeas apresentam maior número de compostos quando comparadas com machos da sua espécie. Na comparação interespecífica nota-se que *Calyptommatus* apresenta um maior número de compostos do que *Nothobachia*. Entre os compostos identificados, os alcanos de longas cadeias correspondem à classe mais abundante nas secreções cloacais, representando entre 90,8% e 95%. Em *C. leiolepis* fêmeas apresentam quase 4% a mais alcanos do que nos machos, enquanto em *N. ablephara* machos apresentam aproximadamente 2% a mais do que as fêmeas. As secreções pré-cloacais dos machos apresentaram alcanos que não puderam ser identificados com clareza, tendo sido tratados como derivados de alcano. Independente de sua exata classificação nas secreções dos poros, o mais interessante é que nestas secreções os alcanos correspondem a uma porcentagem bem inferior à observada nas secreções cloacais.

Alcanos foram detectados em diferentes trabalhos: em secreções epidérmicas de serpentes (Ahern & Downing, 1974) e de lagartos (Weldon & Bagnal, 1987), em secreções pré-cloacais de *Liolaemus* (Escobar *et al.*, 2001; Labra *et al.*, 2001), em secreções femorais de *Lacerta manticola cyreni* (López & Martín, 2005). Embora tenham inicialmente sido considerados como

contaminantes, atualmente os alcanos são reconhecidos como componentes naturais das secreções, inclusive com ocorrência mais comum na epiderme do que se esperava inicialmente (Weldon & Bagnall, 1987). Os alcanos são componentes bastante comuns na natureza e apresentam duas características relevantes em termos de comunicação: são moléculas que se espalham muito bem na superfície hidrofóbica de folhas deixando um amplo sinal e demoram a serem oxidados, deixando um sinal bastante estável que pode permanecer por um longo período (Hemptonne *et al.*, 2001).

Foram observados três ácidos graxos diferentes, um não identificado de ocorrência exclusiva das secreções glandulares de machos e quatro vezes mais abundante em *Calyptommatus*, ácido hexadecanóico de ocorrência em todas as amostras e o ácido octanodecanóico que ocorre apenas nas amostras de esfregaços cloacais e que ocorre sutilmente em maiores quantidades em machos nas duas espécies. Os dois ácidos identificados são frequentes nos trabalhos de análise das secreções glandulares dos Squamata de diferentes famílias, incluindo Teiidae (Ahern & Downing, 1974; Gabirot *et al.*, 2012; López & Martín, 2005a; López & Martín, 2005b; Martín *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2013), sendo inesperada a não ocorrência do ácido octanodecanóico (linoleico) nas secreções glandulares dos machos de *Calyptommatus* e *Nothobachia*. Tais ácidos costumam aparecer em porcentagens mais significativas (em torno de 10%) na maioria das espécies já estudadas, ultrapassando os 90% nas secreções de *Tupinambis merianae* (Martín *et al.*, 2011).

O ácido linoleico tem produção bastante custosa, sendo possível que apenas indivíduos em boas condições de saúde e dieta possam produzi-lo (Martín *et al.*, 2011) e as amostras de poros pré-cloacais com cromatogramas com menor ruído e contaminação e melhor intensidade de picos, correspondem a indivíduos que encontravam-se em cativeiro no laboratório, possibilitando que a dieta artificial tenha influenciado na não ocorrência deste ácido. Os dois ácidos podem ocorrer na sua forma éster em algumas espécies, tendo sido observado apenas nesta forma em *Calyptommatus* e *Nothobachia*. A forma éster dos ácidos graxos é menos volátil e mais estável, sendo a forma predominante destes ácidos em espécies de climas quentes e secos (Martín *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2013). A exata função dos ácidos hexadecanóico e

octanodecanóico em répteis ainda é desconhecida (Martín *et al.*, 2011), mas sabe-se que o ácido hexadecanóico costuma ser o mais abundante em lagartos (Martín *et al.*, 2013) e que ambos possuem função odorífera em outros grupos de organismos como insetos. As oleamidas encontradas nas secreções pré-cloacais são amidas derivadas de ácidos graxos e sua ocorrência não foi observada na literatura sobre répteis.

O único esteroide detectado foi o pregnane com ocorrência apenas nas secreções cloacais, ocorrendo em porcentagens similares nas duas espécies, sendo sutilmente inferior em machos de *N. ablephara*. Este padrão é bastante peculiar por dois motivos: (1) os esteroides e, principalmente, o colesterol têm sido a classe de compostos mais abundantes na maioria das espécies de répteis estudadas (Ahern & Downing, 1974; Burken *et al.*, 1985; Gabirot *et al.*, 2012; Khannoon *et al.*, 2013; Labra *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2013; Pellitteri-Rosa *et al.*, 2014; Weldon & Bagnall, 1987) e (2) não foi observado o pregnane em nenhum destes trabalhos. *T. merianae* (Martín *et al.*, 2011), embora tenha apresentado pequenas porcentagens de alguns esteroides, não apresentou colesterol e a hipótese é que a queratina presente nesta secreção seja responsável por desempenhar o papel do colesterol de proteger os demais compostos da secreção. Teiidae e Gymnophthalmidae formam um grupo monofilético reconhecido como Teiioidea (Pyron *et al.*, 2013), sendo possível que a não ocorrência de colesterol em secreções glandulares seja uma característica deste grupo, porém esta é uma hipótese bastante preliminar que só poderá ser testada quando uma parcela significativa da diversidade deste clado for caracterizada do ponto de vista químico.

Não foram observados alcoóis, tocoferol ou seus derivados em nenhuma das amostras, sendo estes compostos químicos recorrentes na quase totalidade da literatura consultada. O tocoferol pertence a uma classe de compostos, incluindo o precursor da vitamina E, que além de estarem envolvidos com a proteção da secreção em ambientes úmidos (Martín *et al.*, 2011; Pellitteri-Rosa *et al.*, 2014), em altas concentrações pode estar relacionado com a agressividade dos machos e manutenção de sua coloração ventral (Pellitteri-Rosa *et al.*, 2014). A ocorrência de alcoóis parece ser exclusiva apenas para alguns lagartos (Martín *et al.*, 2005b), não tendo sido

observado em *T. merianae*, o que pode indicar que a sua ausência em *C. leiolepis* e *N. ablephara* seja real e não reflexo das condições de amostragem.

A presença e a concentração relativa de cada componente químico nas secreções são de extrema importância para o caráter funcional dos feromônios (López & Martín, 2005b), uma vez que pequenas variações na concentração de um determinado componente podem representar diferenças significativas para os indivíduos de uma dada espécie (Martín & López, 2011). Neste contexto não se pode ignorar as diferenças intra e interespecíficas observadas neste trabalho que, embora não tenham sido expressivas do ponto de vista de ocorrência ou não de um determinado composto, ocorreram em diferentes graus em relação às porcentagens relativas de cada um deles.

5. Conclusões

Nas secreções cloacais foram observados 24 compostos químicos em fêmeas de *Calyptommatus leiolepis* e 21 em fêmeas de *Nothobachia ablephara*, nos machos foram 23 e 20 respectivamente. Entre as classes de compostos químicos identificáveis estão alcanos de cadeias carbônicas longas, dois ácidos graxos (hexadecanóico e octanodecanóico) em sua forma éster e um esteroide (pregnane). Alcanos foram os compostos mais abundantes para machos e fêmeas das duas espécies, representando mais de 90% das amostras. Estes compostos podem auxiliar na dispersão do sinal, por terem elevada capacidade de se espalhar pela camada cuticular de folhas presentes no solo, além de serem compostos estáveis com duração prolongada no meio.

Os dois ácidos graxos presentes nas secreções cloacais são ácidos envolvidos que tem função potencialmente odorífera, além do ácido octanodecanóico ser um composto de elevado custo para produção, podendo sua ocorrência e porcentagem relativa estarem diretamente relacionadas com a condição de saúde e de dieta do indivíduo, informação relevante na comunicação intraespecífica. Estes dois ácidos são comuns em secreções cloacais de répteis de diferentes famílias, porém a porcentagem relativa é variável. O único esteroide observado (pregnane) não foi detectado em nenhuma espécie de réptil que tenha tido secreções cloacais analisadas e sua função exata não foi determinada, mas sabe-se que é um precursor do progesterona.

Nas secreções pré-cloacais dos machos foram observados 28 compostos químicos, 27 em cada espécie, sendo que os dois compostos exclusivos não puderam ser identificados. Embora tenham sido detectados sete derivados de alcanos, a porcentagem relativa dessa classe de composto corresponde a aproximadamente 50%, além de provavelmente corresponderem à cadeias carbônicas mais curtas, contrastando com os mais de 90% dos alcanos de cadeias longas nos esfregaços cloacais. Foram detectadas três amidas derivadas de ácidos graxos cuja ocorrência e função não são encontradas na literatura sobre feromônios de répteis, sendo que uma delas corresponde sozinha a 22,75% da secreção glandular de machos de *C.*

leiolepis. Dois ácidos graxos foram observados, o hexadecanóico (na forma éster) e um que não pôde ser identificado com exatidão.

Contrastando com outros grupos já estudados como, por exemplo, Lacertidae e Iguanidae, não foram observados alcoóis, tocoferol e/ou seus derivados, além das baixas quantidades de esteroides e não ocorrência de colesterol. A única espécie de Teiidae para a qual se tem dados (*Tupinambis merianae*) também não apresenta alcoóis e colesterol e tem baixas porcentagens de outros esteroides.

Calyptommatus leiolepis e *Nothobachia ablephara* são duas espécies que não apresentam dimorfismo sexual em coloração e, aparentemente, não são territoriais (ver Capítulo 1), além de ocorrerem na Caatinga, região caracterizada por um clima quente e bastante seco. Estas características concordam com os dados químicos aqui obtidos, uma vez que a ocorrência de ácidos graxos em sua forma éster é observada em outras espécies de áreas quentes, garantindo maior estabilidade do sinal, além da ausência de tocoferol e derivados que são compostos reconhecidos por evitarem que os demais compostos químicos das secreções oxidem em climas úmidos. A não ocorrência de alcoóis também parece natural uma vez que esta classe de compostos parece ser exclusiva de apenas alguns agrupamentos de espécies e não foi observada em Teiidae.

Este trabalho permitiu aperfeiçoar a metodologia para a análise de secreções cloacais e glandulares em lagartos da família Gymnophthalmidae. Também foram detectados compostos que atuam como feromônios em répteis, embora nem todos os compostos puderam ser identificados. As lacunas sobre este tema no que respeita as espécies de lagartos neotropicais, exige a realização de novos trabalhos. Apenas com informações de uma parcela significativa da diversidade de lagartos é que questões evolutivas poderão ser discutidas do ponto de vista da comunicação química, inclusive seu papel no isolamento reprodutivo.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

Não há dúvidas quanto à importância dos dados sobre a biologia reprodutiva e comunicação químicas das espécies de répteis para melhor compreensão dos padrões de comportamentos e evolutivos das diferentes linhagens. Embora os Squamata representem um grupo bastante diverso em termos morfológicos e de habitats, ainda há poucos dados referentes a estes dois componentes da biologia de suas espécies, principalmente em relação às espécies neotropicais.

As três espécies de Gymnophthalmidae (*Calyptommatus leiolepis*, *Nothobachia ablephara* e *Procellosaurinus tetradactylus*) estudadas sob o ponto de vista reprodutivo neste trabalho, apresentaram reprodução contínua ao longo do ano, sem restrições impostas pelas condições ambientais. Esse mesmo padrão foi observado em *Vanzosaura multiscutata* (Vitt, 1982), outro gimnoftalmídeo que ocorre na Caatinga e é o padrão geral para os lagartos da família, desde que as condições ambientais sejam minimamente favoráveis (Pianka & Vitt, 2003). Há dados na literatura que indicam que espécies neotropicais em locais nos quais as chuvas são imprevisíveis (exemplo: Caatinga) podem apresentar reprodução contínua, enquanto as que ocorrem em locais fortemente sazonais (exemplo: Cerrado) apresentam ciclo reprodutivo que coincide com a época chuvosa (Dal Vechio *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2011; Vitt, 1992; Zanchi-Silva *et al.*, 2013).

Para as três espécies a cópula e fertilização parecem ser simultâneas, a maturação é precoce, o período de incubação é relativamente curto e não há correlação significativa entre o tamanho das fêmeas e dos ovos. Apenas em *C. leiolepis* foi observada evidências de múltiplas desovas, sendo uma das estratégias reconhecidas para aumentar o sucesso reprodutivo em espécies com ninhada fixa e pequena. Em *P. tetradactylus* há dimorfismo sexual referente à coloração e ao número de poros pré-anais, enquanto em *C. leiolepis* e *N. ablephara* o dimorfismo sexual qualitativo ocorre apenas na ocorrência de poros pré-anais exclusivamente nos machos. Nas três espécies as fêmeas são maiores que os machos e não há dimorfismo sexual na forma da cabeça. Esse padrão de dimorfismo é típico de espécies não territorialistas,

nas quais machos não entram em confronto e é o esperado para os lagartos serpentiformes (Pianka & Vitt, 2003), mas diverge do que seria esperado para *P. tetradactylus*, uma vez que espécies filogeneticamente próximas à este apresentam machos com cabeças maiores (exemplo: *Vanzosaura*, Recoder, 2012).

Nas secreções cloacais foram observados 24 compostos químicos em fêmeas de *Calyptommatus leiolepis* e 21 em fêmeas de *Nothobachia ablephara*, nos machos foram 23 e 20 respectivamente. Nas secreções pré-cloacais dos machos foram observados 28 compostos químicos, 27 em cada espécie, sendo que os dois compostos exclusivos não puderam ser identificados. Nos dois tipos de secreção, alcanos correspondem à maior parcela dos componentes químicos (aproximadamente 90% nas secreções cloacais e 50% nas secreções glandulares dos machos).

Os ácidos graxos observados são frequentes na literatura (octanodecanóico em secreções cloacais e hexadecanóico em secreções cloacais e glandulares) e ocorreram em sua forma éster, tipicamente observada em espécies de climas secos e quentes (Martín *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2013), convergindo com as condições ambientais da Caatinga. O único esteroide detectado foi o pregnane, não observado em nenhuma outra espécie de lagarto já estudada. Contrastando com outros grupos já estudados como, por exemplo, Lacertidae e Iguanidae, não foram observados alcoóis, tocoferol e/ou seus derivados, além das baixas quantidades de esteroides e a não ocorrência de colesterol. Os alcoóis parecem ser exclusivos de algumas espécies e também não ocorrem na única espécie de Teiidae para a qual se tem dados químicos (*Tupinambis merianae*, Martín *et al.*, 2011).

Os dados obtidos neste trabalho contribuem na elucidação dos aspectos reprodutivos das três espécies, assim como da caracterização de compostos químicos com potencial ação de feromônio de *C. leiolepis* e *N. ablephara*, que parecem divergir mais nas porcentagens relativas de cada composto do que na exclusividade de alguns, porém ainda há muito que ser feito para que tais resultados sejam utilizados em um contexto evolutivo mais amplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahern, D.G. & D.T. Downing. 1974. *Skin lipids of the Florida indigo snake*. *Lipids*, 9 (1): 8 - 14.
- Alberts, A.C. 1990. *Chemical properties of femoral gland secretions in the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis**. *Journal of Chemical Ecology*, 16 (1): 13 – 25.
- Almeida-Santos, S.M. & A.M. Orsi. 2002. *Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, p. 109-112.
- Almeida-Santos, S.M., H.B. Braz, L.C. Santos, L.R. Sueiro, V.A; Barros, C.A. Rojas & K.N. Kasperoviczus. 2014. *Biologia reprodutiva de serpents: recomendações para coleta e análise de dados*. *Herpetologia Brasileira*, 3 (1): 14-24.
- Alves, F.Q., A.J.S. Argôlo & G.C. Carvalho. 2014. *Reproductive biology of bushmaster *Lachesis muta* (Serpentes: Viperidae) in the Brazilian Atlantic Forest*. *Phyllomedusa*, 13 (2): 99 -109.
- Andrade, D.V., L.B. Nascimento & A.S. Abe. 2006. *Habits hidden underground: a review on the reproduction of the *Amphisbaenia* with notes on four neotropical species*. *Amphibia-Reptilia*, 27: 207-217.
- Andrade, R.S., F.O.B. Monteiro, A.S.S. Ribeiro, L.A.A.S. Ruffeil & P.H.G. Castro. 2012. *Anatomia ultrassonográfica de fígado, baço e trato urogenital de jiboias*. *Rev. Cienc. Agrar.*, 55 (1): 66-73.
- Anjos, L.A. & C.F.D. Rocha. 2008. *Reproductive ecology of the invader species gekkonid lizard *Hemidactylus mabouia* in an area of southeastern Brazil*. *Iheringia, Sér. Zool.*, 98 (2): 205 – 209.
- Atwood, W.H. 1916. *The visceral anatomy of the garter snake*. *Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters*, 531-552.
- Aveiro-Lins, G., O. Rocha-Barbosa, M.G. Salomão, G. Puerto & M.F.C. Loguercio. 2006. *Topographical anatomy of the Blunthead Treesnake*,

- Imantodes cenchoa* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Xenodontinae). Int. J. Morphol., 24 (91): 43-48.
- Balestrin, R.L., L.H. Cappellari & Outeiral, A.B. 2010. Biologia reprodutiva de *Cercosaura schreibersii* (Squamata, Gymnophthalmidae) e *Cnemidophorus lacertoides* (Squamata, Teiidae) no Escudo Sul-Riograndense, Brasil. Biota Neotropical, 10 (1): 131-139.
- Bailey, R.C. & J. Byrnes. *A new, old method for assessing measurement error in both univariate and multivariate morphometric studies*. Syst. Zool., 39 (2): 124-130.
- Bernardo, P.H., R.A. Guerra-Fuentes & H. Zaher. 2011. *Notes on the reproductive biology of the lizard Colobodactylus dalcyanus Vanzolini & Ramos, 1977* (Squamata, Gymnophthalmidae). Herpetological Bulletin, 118: 36-37.
- Böhn, M., B. Collen, J.E.M. Baillie, P. Bowles & P. Chanson. 2013. *The conservation status of the world's reptiles*. Biological Conservation, 157: 372-385.
- Braz, H.B., K.N. Kasperoviczus & S.M. Almeida-Santos. 2014. *Reproductive ecology and diet of the fossorial snake Phalotris lativittatus in the Brazilian Cerrado*. Herpetological Journal, 24: 49-57.
- Brown, G.P. & R. Shine. 2006. *Why do most tropical animals reproduce seasonally? Testing hypotheses on an Australian snake*. Ecology, 87 (1): 133 -143.
- Burken, R.R., P.W. Wertz & D.T. Downing. 1985. *A survey of polar and nonpolar lipids extracted from snake skin*. Comp. Biochem. Physiol., 81B (2): 315 – 318.
- Camacho, A.G. *Evolução da fossorialidade em lagartos da tribo Gymnophthalmini* (Gymnophthalmidae, Squamata). Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia. 1-180 pp.

- Capula, M. & L. Luiselli. 1993. *Ecology of an alpine population of the Slow Worm, Anguis fragilis LINNAEUS, 1758. Thermal biology of reproduction*. Herpetozoa, 6 (1/2): 57 – 63.
- Carvalho, C. M. 1992. *Estratégias reprodutivas de duas espécies simpátricas de lagartos do gênero Gymnophthalmus de Roraima, Brasil (Sauria, Teiidae)*. Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas. 229 pp.
- Cassel, M., C. Strüssmann & A. Ferreira. 2012. *Histological evidence of reproductive activity in lizards from the APM Manso, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso State, Brazil*. Maringá, 34 (3): 327 – 334.
- Clark, R.W. 2007. *Public information for solitary foragers: timber rattlesnakes use conspecific chemical cues to select ambush sites*. Behavioral Ecology, 18: 487 – 490.
- Cooper, Jr. W.E. & V. Pérez-Mellado. 2001. *Omnivorous lacertid lizards (Gallotia) from El Hierro, Canary Islands, can identify prey and plant food using only chemical cues*. Can. J. Zool., 79: 881 – 887.
- Cooper, Jr. W.E. * R. Hartdegen. 1999. *Discriminative response to animal, but not plant, chemical by an insectivorous, actively foraging lizard, Scincella lateralis, and differential response to surface and internal prey cues*. Journal of Chemical Ecology, 25 (7): 1531 – 1541.
- Cottone, A.M. & A.M. Bauer. 2009. *Sexual size dimorphism, diet, and reproductive biology of the Afro-Asian Sand Snake, Psammophis schokari (Psammophidae)*. Amphibia-Reptilia, 30: 331-340.
- Cox, R.C. & R. Calsbeek. 2009. *Sex-specific selection and intraespecific variation in sexual size dimorphism*. Evolution, 64 (3): 798 - 809.
- Cox, R.C., S.L. Skelly & H.B. John-Alder. 2003. *Comparative tests of adaptive hypotheses for sexual size dimorphism in lizards*. Evolution, 57 (7): 1653-1669.

- Crook, J.M. & T.S. Parsons. 1980. *Visceral anatomy of the Amphisbaenia*. Journal of Morphology, 163: 99-133.
- Cruz, F.B. 1994. *Actividad reproductiva em Vanzosaura rubricauda (Sauria: Teiidae) del Chaco occidental em Argentina*. Cuadernos de Herpetología, 8 (1): 112-118.
- Dal Vechio, F., R. Recoder, H. Zaher & M.T. Rodrigues. 2014. *Natural history of Micrablepharus maximiliani (Squamata: Gymnophthalmidae) in a Cerrado region of northeastern Brazil*. Zoologia, 31(2): 114-118.
- De Souza, A.O., J. de Souza, G. Puerto, J.C. Cogo. 2009. *Estudo anatômico do sistema digestório da serpente da espécie Oxyrhopus guibei (falsa coral)*. VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, Universidade do Vale do Paraíba, 130 – 133.
- Dias, Dina-Mara. 2012. *História natural do lagarto partenogenético Leposoma percarinatum (Squamata: Gymnophthalmidae) em floresta amazônica, Pará, Brasil*. Mestrado. Museu Paraense Emílio Goeldi, Universidade Federal do Pará. 1-38 pp.
- Díaz-Gómez, J.M. 2003. *Anatomia visceral de Feylinia grandisquamis (Squamata: Scincidae). Comparaciones com otros escamados de patrón corporal semejante*. Cuad. Herptol., 17 (1-2): 73-86.
- Diehl, L.S. 2007. *Biologia reprodutiva de Cercosaura schreibersii (Wiegmann, 1834) (Sauria: Gymnophthalmidae) no sul do Brasil*. Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 1-48 pp.
- Dunham, A.E. & D.B. Miles. 1985. *Patterns of covariation in life history traits of squamate reptiles: the effect of size and phylogeny reconsidered*. Amer. Nat. 126: 231 – 257.
- 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.

- Feltrim, A.C. 2002. *Dimorfismo sexual em Cnemidophorus lacertoides (Squamata, Teiidae) do sul da América do Sul*. Phyllomedusa, 1 (2): 75-80.
- Ferreira, A., D.N. Silva, M. Van Sluys & H. Dolder. 2009. *Seasonal changes in testicular and epididymal histology of the tropical lizard, Tropidurus itambere (Rodrigues, 1987) during its reproductive cycle*. Braz. J. Biol., 69 (2): 429-435.
- Ferreira, A., V.O. Kihara & M. Mehanna. 2011. *Reproductive strategies of brazilian lizards of the genus Tropidurus Rodrigues 1987, (Squamata, Tropiduridae) in the temporal and spatial*. International Journal of Morphology, 29 (4): 1414-1421.
- Fitch, H.S. *Reproductive cycles in lizards and snakes*. 1970. 1º ed. Lawrence, Kansas: The University of Kansas Printing Service; 276p.
- 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.
- Gans, C. 1975. *Tetrapod limblessness: evolution and functional corollaries*. Amer. Zool., 15: 455-467.
- Garda, A.A., G.C. Costa, F.G.R. França, L.G. GIUGLIANO, G.S. Leite, D.O. Mesquita, C. Nogueira, L. Tavares-Bastos, M.M. Vasconcellos, G.H.C. Vieira, L.J. Vitt, F.P. Werneck, H.C. Wiederhecker & G.R. Colli. 2012. *Reproduction, Body Size, and Diet of Polychrus acutiostis (Squamata: Polychrotidae) in Two Contrasting Environments in Brazil*. Journal of Herpetology, 46 (1): 2-8.
- Garda, A.A., P.H.S. de Medeiros, M.B. Lion, M.R.M. de Brito, G.H.C. Vieira & D.O. Mesquita. 2014. *Autoecology of Dryadosaura nordestina*

- (Squamata: Gymnophthalmidae) from Atlantic forest fragments in Northeastern Brazil. *Zoologia*, 31 (5): 418-425.
- Gogliath, M., L.B. Ribeiro & E.M.X. Freire. 2010. *Forced copulation attempt in the Blue-tailed lizard, Micrablepharus maximiliani (Reinhardt & Luetken, 1862) (Squamata, Gymnophthalmidae) in the Caatinga of Northeastern Brazil*. *Biota Neotrop.*, 10 (4): 347 – 350.
- Goldberg, S.R. 2009. *Note on reproduction of Pholidobolus montium (Squamata: Gymnophthalmidae) from Ecuador*. *Bull. Chicago Herp. Soc.*, 44 (11): 167 – 168.
- Greene, M.J., S.L. Stark & R.T. Mason. 2001. *Pheromone trailing behavior of the brown tree snake, Boiga irregularis*. *Journal of Chemical Ecology*, 27 (11): 2193 – 2201.
- Heideman, N.J.L., D.G. Mulcahy, Jack W. Sites Jr., M.G.J. Hendricks & S.R. Daniels. *Cryptic diversity and morphological convergence in threatened species of fossorial skinks in the genus Scelotes (Squamata: Scincidae) from the Western Cape Coast of South Africa: Implications for species boundaries implications for species boundaries, digit reduction and conservation*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 823 – 833.
- Hemptinne, J.L., G. Lognay, M. Doumbia & A.F.G. Dixon. 2001. *Chemical nature and persistence of the oviposition deterring pheromone in the tracks of the larvae of the two spot ladybird, Adalia bipunctata (Coleoptera: Coccinellidae)*. *Chemoecology*, 11: 43 – 47.
- 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 semiochemical dispersion*. *Journal of Morphology*, 291: 42 – 50.
- Janeiro-Cinquini, T.R.F. 2004. *Variação anual do sistema reprodutor de fêmeas de Bothrops jararaca (Serpentes, Viperidae)*. *Iheringia, Sér. Zool, Porto Alegre*, 94 (3): 325 – 328.

- Jared, C., M.M. Antoniazzi & M.T. Rodrigues. 2009. *Alexandresaurus camacan* (Alexandre's Lizard; Calanguinho do Alexandre). Reproductive behavior. *Herpetological Review*, 40 (2): 218-219.
- Jolicoeur, P. & J.E. Mosimann. 1960. *Size and shape variation in the painted turtle. A principal component analysis*. *Growth*, 24: 339-354.
- Khannoon, E.R., D.H. Lunt, S. Schulz & J.D. Hardege. 2013. *Divergence of scent pheromones in allopatric populations Acanthodactylus boskianus* (Squamata: Lacertidae). *Zoological Science*, 30: 380-385.
- Klein, W., C. Reuter, W. Böhme & S.F. Perry. 2004. *Lungs and mesopneumonia of scincomorph lizards* (Reptilia: Squamata). *Organisms, Diversity & Evolution*, 5 (2005): 47-57.
- Kummrow, M.S., D.A. Smith, G. Crawshaw & G.F. Mastromonaco. *Characterization of fecal hormone patterns associated with the reproductive cycle in female veiled chameleons (Chamaeleo calyptratus)*. *General and Comparative Endocrinology*, 168 (2010): 340 – 348.
- 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.
- León, J.R. & L.J. Ruiz. 1971. *Reproduction de la lagartija, Ameiva bifrontata* (Sauria: Teiidae). *Carib. J. Sci.*, 11 (3-4): 195-201.
- López, P. & J. Martín. 2005a. *Intersexual differences in chemical composition of precloacal gland secretions of the amphisbaenian Blanus cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (12): 2913 – 2921.

- López, P. & J. Martín. 2005b. *Chemical compounds from femoral gland secretions of male Iberian rock lizards, Lacerta monticola cyreni*. Z. Naturforsch, 60c: 632 – 636.
- Marantz, C.A. & M.A. Patten. 2010. *Quantifying subspecies analysis: a case study of morphometric variation and subspecies in the Woodcreeper genus Dendrocolaptes*. Ornithological Monographs, 2010 (67): 123-140.
- Martin, J. & P. López. 2000. *Chemoreception, symetry and mate choice in lizards*. The Royal Society, 267: 1265-1269.
- Martín, J. & P. López. 2011. *Pheromones and reproduction in Reptiles*. In: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates. Reptiles*, 3. Academic Press, San Diego, California, 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), e30108.
- Martin, J. & P. López. 2013. *Responses of female rock lizards to multiple scent marks of male: effects of male age, male density and scent over-marking*. Behavioural Processes, 94: 109 - 114.
- Martin, J. & P. López. 2015. *Condition-dependent chemosignals in reproductive behavior of lizards*. Hormones and behaviour, 68: 14 - 24.
- Martín, J., S.C. Hamut, M.E. Manes & P. López. 2011. *Chemical constituents of the femoral gland secretions of male tegu lizards (Tupinambis merianae) (Family Teiidae)*. Z. Naturforsch, 66c: 434 – 440.
- Mason, R.T. & M.R. Parker. 2010. *Social behavior and pheromonal communication in reptiles*. J. Comp. Physiol. A., 196: 729 - 749.
- Mathies, T. 2011. *Reproductive cycles of tropical snakes*. 511-550 pp. In: R.D. Aldridge e D.M. Sever, *Reproductive Biology and Phylogeny os Snakes*. Boca Raton, CRC Press.

- Montechiaro, L. 2008. *Biologia de Ophiodes fragilis (Squamata: Anguinae): dieta e reprodução, no sul do Brasil*. Mestrado. Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Biodiversidade Animal. 1-75 pp.
- Moraes, R.C. 1993. *Ecologia das espécies de Calyptommatus (Sauria, Gymnophthalmidae) e partilha de recursos com outros dois microteídeos*. Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Departamento de Zoologia. 1-115 pp.
- Navega-Gonçalves, M.E.C. 2009. *Anatomia visceral comparada de seis espécies de Amphisbaenidae (Squamata: Amphisbaenia)*. Zoologia, 26 (3): 511 – 526.
- Navega-Gonçalves, M.E.C. & J.R.M.C. da Silva. 2013. *Sistema respiratório de Amphisbaena vermicularis e Amphisbaena microcephala (Squamata, Amphisbaenia, Amphisbaenidae)*. Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre, 103 (1): 20 – 30.
- Nimer, E. 1979. *Climatologia do Brasil*. IBGE, Rio de Janeiro.
- Nisa, C.R. 2012. *Taxonomia e diferenciação geográfica em Nothobachia ablephara (Squamata, Gymnophthalmidae)*. Iniciação Científica. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 1-42 pp.
- Orofino, R.P., L. Pizzatto & O.A.V. Marques. 2010. *Reproductive biology and food habits of Pseudoboa nigra (Serpentes: Dipsadidae) from the Brazilian cerrado*. Phyllomedusa, 9 (1): 53-61.
- Patchell, F.C. & R. Shine. 1986. *Food habits and reproductive biology of the Australian legless lizards (Pygopodidae)*. Copeia, 1986 (1): 30 – 39.
- 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.

- Pellitteri-Rosa, D., J. Martín, P. López, A. Bellati, R. Sacchi, M. Fasola & P. Galeotti. 2014. *Chemical polymorphism in male femoral gland secretions matches polymorphic coloration in common wall lizards (Podarcis muralis)*. Chemoecology, 24: 67 – 78.
- Pianka, E. R. & Vitt, L. J. Lizards: windows to the evolution of diversity. Califórnia: University of California Press, 2003. 335 pp.
- Pizzato, L. & O.A.V. Marques. 2007. *Reproductive ecology of boine snakes with emphasis on Brazilian species and a comparison to pythons*. South American Journal of Herpetology, 2 (2): 107-122 pp.
- Pough, H., R.M. Andrews, J.E. Cadle, M.L. Crump, A.H. Savitzky & K.D. Wells. *Herpetology* 2^o ed. New Jersey: Prentice Hall 2001; 577pp.
- 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.
- Ramos-Pallares, E., V.H. Serrano-Cardozo & P. Ramírez-Pinilla. 2010. *Reproduction of Ptychoglossus bicolor (Squamata: Gymnophthalmidae) in an Andean Coffee Shade Plantation in Colombia*. South American Journal of Herpetology, 5(2): 143-150.
- Recoder, R.S. 2012. *Variação morfológica geográfica em lagartos dos gêneros Micrablepharus e Vanzosaura (Squamata, Gymnophthalmidae, Gymnophthalmini) e teste de hipóteses causais com auxílio de modelagem de distribuição potencial*. Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Departamento de Zoologia. 1-66 pp.
- Roberto, I.J. & C. Albano. 2012. *Aspects of the clutch size and oviposition period of Leposoma baturitensis (Squamata: Gymnophthalmidae)*. Herpetology Notes, 5: 445 – 446.
- 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, P.L.B. & M.T. Rodrigues. 2005. *Electivities and resource use by na assemblage os lizards endemic to the dunes of the São Francisco River, northeastern, Brazil*. Papéis Avulsos de Zool., S. Paulo, 45 (22): 261-284.
- Rodrigues, M.T. 1984. *Nothobachia ablephara: novo gênero e espécie do nordeste do Brasil (Sauria: Teiidae)*. Papéis Avulsos Zool., S. Paulo, 35 (28): 361-366.
- Rodrigues, M.T. 1991a. *Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. I. Introdução à área e descrição de um novo gênero de microteiideos (Calyptommatus) com notas sobre sua ecologia, distribuição e especiação (Sauria, Teiidae)*. Papéis Avulsos de Zool., S. Paulo, 37 (19): 285-320.
- Rodrigues, M.T. 1991b. *Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. II. Psilophthalmus: um novo gênero de microteiidae sem pálpebra (Sauria, Teiidae)*. Papéis Avulsos de Zoologia, S. Paulo, 37 (19): 321-327.
- Rodrigues, M.T. 1991c. *Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. III. Procellosaurinus: um novo gênero de microteiédeos sem pálpebra, com a redefinição do gênero Gymnophthalmus (Sauria, Teiidae)*. Papéis Avulsos de Zool., S. Paulo, 37 (21): 329-342.
- Rodrigues, M.T. 2003. *Herpetofauna da Caatinga*. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva. (Org.). *Ecologia e Conservação da Caatinga*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003, v. 4, p. 181-236.
- Rodrigues, M.T. 2005. *Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso*. Megadiversidade, 1 (1): 87-94.
- Rodrigues, M.T. & E.M. Santos. 2008. *A new genus and species of eyelid-less and limb reduced gymnophthalmid lizard from the northeastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae)*. ZOOTAXA, 1873: 50-60.

- Roscito, J.G. 2010. *Desenvolvimento embrionário e a evolução da fossorialidade nos lagartos da tribo Gymnophthalmini (Squamata, Gymnophthalmidae)*. Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia. 1-279 pp.
- Roscito, J.G. & M.T. Rodrigues. 2010. *Comparative cranial osteology of fossorial lizards from the tribe Gymnophthalmini (Squamata, Gymnophthalmidae)*. Journal of Herpetology, 271: 1352-1365.
- Roscito, J.G. & M.T. Rodrigues. 2013. *A comparative analysis of the post-cranial skeleton of fossorial and non-fossorial Gymnophthalmid lizards*. Journal of Morphology, (2013): 2-14.
- Runemark, A., M. Gabirot & E.I. Svensson. 2011. *Population divergence in chemical signals and the potential for premating isolation between islet- and mainland populations of the Skyros wall lizard (Podarcis gaigeae)*. Journal of Evolutionary Biology, 24: 795 – 809.
- Santos, L.C. 2013. *Biologia reprodutiva comparada de Amphisbaenidae (Squamata, Amphisbaenia) do Brasil*. Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia. 1-260 pp.
- Santos, M.V.G., I.G.S. Macedo, R.S. Sousa, M. Gogliath & L.B. Ribeiro. 2012. *Diet of Nothobachia ablephara (Squamata: Gymnophthalmidae) in a Caatinga área of the San Francisco Valley in northeastern Brazil*. Herpetology notes, 5: 305-307.
- Scott, M.L., M.J. Whiting, J.K. Webb & R. Shine. 2013. *Chemosensory discrimination of social cues mediates space use in snakes, Cryptophis nigrescens (Elapidae)*. Animal Behaviour, 85: 1493 – 1500.
- Shine, R. 1986. *Food habits, habitats and reproductive biology of four sympatric species of varanid lizards in Tropical Australia*. Herpetologica, 42 (3): 346 – 360.
- Shine, R. 1989. *Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence*. Quart. Rev. Biol., 64: 419 - 461.

- Shine, R. 1994. *Sexual size dimorphism in snakes revisited*. Copeia, 1994: 326-345.
- Shine, R. & X. Bonnet. 2009. *Reproductive biology, population viability, and options for field management*. In: S.J. Mullin e R.A. Seigel, Snakes – Ecology and Conservation. Cornell University Press, Ithaca.
- Siedschlag, A.C., M.L. Benozzati, J.C. Passoni & M.T. Rodrigues. 2010. *Genetic structure, phylogeny, and biogeography of Brazilian eyelid-less lizards of genera Calyptomatus and Nothobachia (Squamata, Gymnophthalmidae) as inferred from mitochondrial DNA sequences*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 56 (2010): 622-630.
- Souza, G.B & M.P. Rosso. 2010. *Aspectos ecológicos de Liolaemus occipitalis Boulenger, 1885 (Squamata, Tropiduridae), Morro dos Conventos, Araranguá, Santa Catarina, Brasil*. Revista Iniciação Científica, 8 (1): 83 – 92.
- Symonds, M.R.E. & M.A. Elgar. 2008. *The evolution of pheromone diversity*. Trends in Ecology and Evolution, 23 (4): 220 – 228.
- Teixeira, R.L. & F.R. Fonseca. 2003. *Tópicos ecológicos de Leposoma scincoides (Sauria, Gymnophthalmidae) da região de Mata Atlântica de Santa Teresa, Espírito Santo, sudeste do Brasil*. Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, 15 (N. Sér.): 17-28.
- Teixeira Jr., M. *Os lagartos do vale do rio Peruaçu, MG, Brasil: Aspectos biogeográficos, história natural e implicações para a conservação*. Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia. 132 pp.
- Tinkle, D.W., H.M. Wilbur & S.G. Tilley. 1969. *Evolutionary strategies in lizard reproduction*. Evolution, 24 (1): 55-74 pp.
- Tsai, T. & M. Tu. 2000. *Reproductive Cycle of Male Chinese Green Tree Vipers, Trimeresurus s. stejnegeri, in Northern Taiwan*. Journal of Herpetology, 34(3) 424-430.

- Uetz, P. 2015. The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>. Acessado em: 31 de março de 2015.
- Veludo, L.B.A. 2011. *Ecologia de Anolis meridionalis (Squamata, Polychrotidae) no Cerrado brasileiro*. Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Animal. 1-47 pp.
- Vieira, G.H.C., D.O. Mesquita, A.K. Péres Jr., K. Kitayama & G.R. Colli. 2000. *Micrablepharus atticolus (NCN)*. *Natural History*. Herpetological Review, 31 (4): 241 – 242.
- Vitt, L.J. 1973. *Reproductive biology of the Anguid lizard, Gerrhonotus coeruleus principis*. Herpetologica, 29 (2): 176 – 184.
- Vitt, L.J. 1982. *Sexual dimorphism and reproduction in the microteiid lizard, Gymnophthalmus multiscutatus*. Journal of Herpetology, 16 (3): 325 – 329.
- Vitt, L.J. 1986. *Reproductive tactics of sympatric Gekkonid lizards with a comment on the evolutionary and ecological consequences in invariant clutch size*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 1986 (3): 773-786.
- Vitt, L.J. 1992. *Diversity of reproductive strategies among Brazilian lizards and snakes: the significance of lineage and adaptation*. In: Hamlett, W.C., Reproductive biology of South American vertebrates. 1^a edição. New York: Springer-Verlag. 1992. 328 pp.
- Vitt, L.J. & J.P. Cadwell. *Herpetology: an introduction biology of amphibians and reptiles*. 3^a edição. San Diego: Elsevier Inc., 2009. 697 pp.
- Weldon, P.J. & D. Bagnall. 1987. *A survey of polar and nonpolar skin lipids from lizards by thin-layer chromatography*. Comp. Biochem. Physiol., 87B (2): 345 – 349.
- Yonenaga-Yassuda, Y., M.T. Rodrigues & K.C.M. Pellegrino. 2005. *Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in*

Calyptommatus and the karyotypes of Psilophthalmus and Tretioscincus (Squamata, Gymnophthalmidae). Genetics and Molecular Biology, 28, 4, 700-709.

Zar, J.H. *Biostatistical analysis*. 5ª edição. Nova Jersey: Pearson Prentice Hall, 2010. 944 pp.

Zuffl, M.A.L., R. Sacchi, F. Pupin & T. Cencetti. 2011. *Sexual size and shape dimorphism in the Moorish gecko (Tarentola mauritanica, Gekkota, Phyllodactylidae)*. North-Western Journal of Zoology, 7 (2): 189 – 197.

RESUMO

Embora os Squamata representem um grupo bastante diverso, pouco se conhece sobre sua biologia reprodutiva e caracterização química de secreções glandulares e cloacais, principalmente no que se diz respeito à fauna neotropical. A família Gymnophthalmidae reúne lagartos neotropicais, pequenos e com ampla diversidade morfológica e de habitats. Apesar de serem alvos de estudos moleculares recentes, o conhecimento acerca de sua biologia reprodutiva e composição química de feromônios é praticamente nulo em especial para as espécies serpentiformes. *Calyptommatus leiolepis*, *Nothobachia ablephara* e *Procellosaurinus tetradactylus* são gimnoftalmídeos simpátricos para os quais não há dados reprodutivos e químicos. Foram analisados 388 indivíduos de *C. leiolepis*, 180 de *N. ablephara* e 47 de *P. tetradactylus* do campo de dunas de Alagoado, Bahia. As três espécies apresentaram reprodução bastante prolongada, possivelmente contínua. Apenas machos de *C. leiolepis* apresentaram variação mensal no volume testicular com menores volumes entre agosto e dezembro, porém foi detectada produção de espermatozoides dentro deste período. Cópula e fertilização ocorrem simultaneamente. Todas as desovas apresentaram número fixo de 2 ovos e não há correlação entre número ou tamanho dos ovos com o CRC das fêmeas para as três espécies. Há evidências de múltiplas desovas apenas em *C. leiolepis*. O período de incubação das três espécies é relativamente curto e a maturação é precoce, ocorrendo provavelmente no primeiro ano de vida. As condições ambientais de temperatura e umidade relativa do ar não são restritivas ao ciclo reprodutivo, mas estão relacionadas com os picos reprodutivos das fêmeas de *C. leiolepis* e *N. ablephara*. Fêmeas são maiores do que os machos e não há dimorfismo sexual para a forma da cabeça. Entre os compostos químicos detectados em secreções de machos e fêmeas de *C. leiolepis* e *N. ablephara* há alcanos e derivados, ácidos graxos e derivados, um esteroide e diversos compostos não identificados. As principais diferenças intra e interespecíficas estão relacionadas com a porcentagem relativa dos compostos. Os ácidos graxos encontram-se em sua forma éster, típica de espécies de climas quentes e secos.

Palavras-chave: ciclo reprodutivo, comunicação química, Gymnophthalmidae.

ABSTRACT

Squamata represents a very diverse group but little is known about their reproductive biology and chemical characterization of glandular and cloacal secretions, particularly concerning the Neotropical fauna. Gymnophthalmidae is a Neotropical family that comprises small to medium-sized lizards (microteiids) and shows a huge diversity of morphologies and habitats. Although targeted by recent molecular studies the knowledge of their reproductive biology and pheromone characterization is poorly known, especially for fossorial species. *Calyptommatus leiolepis*, *Nothobachia ablephara* and *Procellosaurinus tetradactylus* are sympatric and there are no data about their reproductive strategies and chemical composition of cloacal and glandular secretions. Gonads of 388 specimens of *C. leiolepis*, 180 specimens of *N. ablephara* and 47 specimens of *P. tetradactylus* from Alagoado sand dune, Bahia were analyzed. The three species showed a very extended reproduction, possibly continuous. Variation of testis volume was observed only in males of *C. leiolepis* with lower values between August and December but sperm production was detected within this period. Clutch size always comprised two eggs and there is no correlation between the number or size of the eggs with female SVL. Only female of *C. leiolepis* showed evidence of more than one clutch per year. The incubation period of the three species is relatively short and early maturation is likely occurring in the first year of life. The environmental conditions of temperature and relative humidity are not restrictive to reproductive activity, but are related to the reproductive peaks of females of *C. leiolepis* and *N. ablephara*. Females are larger than males and there is no sexual dimorphism in head shape. Among the chemical compounds detected in secretions of male and female of *C. leiolepis* and *N. ablephara* there are alkanes and derivatives, fatty acids and derivatives, a steroid and several unidentified compounds. The intra and interspecific differences are mostly related to the relative percentages of the compounds. Fatty acids are found in its ester form, typical of species that lives in hot and dry climates.

Key-Words: reproductive cycle, chemical communication, Gymnophthalmidae.

APÊNDICES

Apêndice I – Lista do material analisado

Todos os indivíduos foram coletados em Alagoado, no município de Casa Nova, Bahia e encontram-se no Laboratório de Herpetologia, do Departamento de Zoologia, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Calyptommatus leiolepis: **2013** – JAN (MTR 24368 - 88), FEV (MTR 24398 – 21, 24444 - 79), MAR (MTR 28764 - 28807), MAI (MTR 28708 – 11, 28713 - 49), JUN (MTR 28820 - 38), JUL (MTR 28850 - 77), AGO (MTR 28911 – 39, 28941), SET (MTR 28955 - 65), OUT (MTR 28980 - 90), NOV (MTR 29003 - 13) e DEZ (MTR 29061 - 72). **2014** – JAN (MTR 29081 - 94), FEV (MTR 29098 - 114), ABR (MTR 29119 – 35, 29141 - 51), MAI (MTR 29186 - 200), JUN (MTR 29208 - 27), JUL (MTR 29252 - 60) e AGO (MTR 29273 - 83).

Nothobachia ablephara: **2013** – JAN (MTR 24352 - 67), FEV (MTR 24389 – 97, 24426 -43), MAR (MTR 28752 - 63), MAI (MTR 28697 - 707), JUN (MTR 28811 - 19), JUL (MTR 28842 - 49), AGO (MTR 28902 – 07, 28922 - 27), SET (MTR 28945 - 54), OUT (MTR 28970 - 79), NOV (MTR 28993 - 29002) e DEZ (MTR 29058 - 29060). **2014** – JAN (MTR 29076 - 80), FEV (MTR 29096 - 97), ABR (MTR 29117 – 18, 29125 – 29, 29136 - 40), MAI (MTR 29182 - 85), JUN (MTR 29202 - 07), JUL (MTR 29240 - 51) e AGO (MTR 29261 - 72).

Procellosaurinus tetradactylus: **2013** – JAN (MTR 24349 - 51), FEV (MTR 24422 - 25), MAR (MTR 28750 - 51), MAI (MTR 28696), JUN (MTR 28809 - 10), JUL (MTR 28839 - 41), AGO (MTR 28889 – 28891, 28897 – 98, 28900 – 01, 28910), SET (MTR 28942 - 44), OUT (MTR 28967 - 69), NOV (MTR 28991 -92) e DEZ(MTR 29054 - 57). **2014** – JAN (MTR 29075), FEV (MTR 29095), ABR (MTR 29130 - 31), MAI (MTR 29178 - 81), JUN (MTR 29201) e JUL (MTR 29237).

Apêndice II – Amostras mensais

Calyptommatus leiolepis: total de indivíduos coletados em cada um dos meses amostrados separados por sexo.

		<i>fêmeas</i>	<i>machos</i>	<i>juvenis</i>	<i>total</i>
2013	JAN	16	5	0	21
	FEV	43	7	0	60
	MAR	20	21	3	44
	ABR	0	0	0	0
	MAI	24	16	1	41
	JUN	16	3	0	19
	JUL	19	9	0	28
	AGO	13	6	4	23
	SET	6	5	0	11
	OUT	6	5	0	11
	NOV	11	1	0	12
	DEZ	9	2	0	11
2014	JAN	10	4	0	14
	FEV	16	1	0	17
	MAR	0	0	0	0
	ABR	10	8	3	21
	MAI	8	7	0	15
	JUN	18	2	0	20
	JUL	8	1	0	9
	AGO	5	6	0	11
TOTAL		258	119	11	388

Nothobachia ablephara: total de indivíduos coletados em cada um dos meses amostrados separados por sexo.

		<i>fêmeas</i>	<i>machos</i>	<i>juvenis</i>	<i>total</i>
2013	JAN	7	8	1	16
	FEV	10	17	0	27
	MAR	2	9	1	12
	ABR	0	0	0	0
	MAI	4	7	0	11
	JUN	4	4	1	9
	JUL	2	3	3	8
	AGO	4	5	3	12
	SET	4	6	0	10
	OUT	5	5	0	10
	NOV	3	4	3	10
	DEZ	2	1	0	3
2014	JAN	1	4	0	5
	FEV	0	2	0	2
	MAR	0	0	0	0
	ABR	5	5	2	12
	MAI	2	2	0	4
	JUN	3	3	0	6
	JUL	8	4	0	12
	AGO	4	5	2	11
TOTAL		70	94	16	180

Procellosaurinus tetradactylus: total de indivíduos coletados em cada um dos meses amostrados separados por sexo.

		<i>fêmeas</i>	<i>machos</i>	<i>juvenis</i>	<i>total</i>
2013	JAN	2	1	0	3
	FEV	1	3	0	4
	MAR	1	1	0	2
	ABR	0	0	0	0
	MAI	0	1	0	1
	JUN	1	1	0	2
	JUL	0	3	0	3
	AGO	3	5	0	8
	SET	1	2	0	3
	OUT	1	2	0	3
	NOV	1	1	0	2
	DEZ	2	2	0	4
2014	JAN	0	1	0	1
	FEV	1	0	0	1
	MAR	0	0	0	0
	ABR	0	1	1	2
	MAI	1	3	0	4
	JUN	0	1	0	1
	JUL	3	0	0	3
	AGO	0	0	0	0
TOTAL		18	28	1	47

Apêndice III - Técnica Histológica para Preparação de Testículos de Squamata

1. Desidratação

Série gradual de álcool:

- 1° - Álcool 80% por 30 minutos.
- 2° - *Fast Green* ou álcool 95% por 30 minutos.
- 3° - Álcool 100% por 30 minutos.
- 4° - Álcool 100% por 30 minutos.
- 5° - Álcool 100% por 60 minutos.

2. Infiltração

Solução de infiltração: 50 ml de resina líquida + 0,5 g do ativador.

Após o último banho de álcool 100%, colocar o material em solução de álcool 100% e solução de infiltração (meio a meio) e deixar por aproximadamente 12 horas.

Para a infiltração da historresina, passar o material para um frasco com historresina pura e colocá-lo por aproximadamente 8 horas no vácuo com a tampa aberta.

3. Emblocamento

Mistura: 5 ml de resina + 0,35 ml de endurecedor.

Preencher o molde com resina e posicionar o material.

Aproximadamente 12 horas para endurecimento total das peças.

4. Coloração: Azul de Toluidina

Colocar as lâminas em banho de Toluidina – 3 min.

Lavar na água destilada por 10 segundos.

Apêndice IV – Variações morfológicas no aparelho reprodutor feminino

Calyptommatus leiolepis

Na imagem à esquerda pode-se observar dois folículos em fase avançada de vitelogênese (seta preta) que ainda não foram ovulados. O oviduto esquerdo está mais visível, mas ambos encontram-se opacos e pregueados (seta vermelha). Há corpos adiposos em pequena quantidade na porção caudal da cavidade abdominal. A imagem da direita mostra dois ovos já no oviduto, é possível observar o deslocamento do tubo digestivo para melhor alojamento dos ovos.

Nothobachia ablephara

Na imagem à esquerda pode-se observar dois folículos em início do processo de vitelogênese (seta preta), apresentando volume bastante superior aos demais folículos e coloração amarelada. O oviduto esquerdo não está visível na imagem, mas o oviduto direito (seta vermelha) está bastante opaco e pregueado. Há corpos adiposos em pequena quantidade na porção caudal da cavidade abdominal. A imagem da direita mostra dois ovos já no oviduto.

Procellosaurinus tetradactylus

Na imagem à esquerda pode-se observar dois folículos em início do processo de vitelogênese (seta preta), apresentando volume bastante superior aos demais folículos, que não estão visíveis, e coloração amarelada. Os ovidutos (seta vermelha) estão bastante opacos e pregueados. Não há corpos adiposos na cavidade abdominal. A imagem da direita mostra ovários com folículos pré-vitelogênicos (seta preta), embora com volume sutilmente aumentado e ovidutos muito desenvolvidos (seta vermelha), sendo indicativo de uma desova recente.

Apêndice IV – Cromatogramas

Para as amostras de esfregaços cloacais de cada um dos sexos de *Calypptommatus leiolepis* foi escolhido um dos sete cromatogramas obtidos, pois não foram observadas diferenças significativas entre eles.

Nos cromatogramas referentes aos esfregaços cloacais, os compostos foram obtidos entre os tempos de retenção de 18 e 40 minutos e nos das secreções das glândulas pré-cloacais, os compostos encontram-se entre os tempos de retenção de 10 e 30 minutos. Os picos observados antes dos tempos de retenção mínimos correspondem a compostos do próprio solvente, enquanto os picos observados após os tempos máximos correspondem a ruídos ou apresentaram intensidades muito baixas.

Esfregaço cloacal – fêmeas de *C. leiolepis*

Abundance

Time→

Esfregaço cloacal – machos de *C. leiolepis*

Abundance

Esfregaço cloacal – fêmeas de *N. ablephara*

Abundance

Time-->

Esfregaço cloacal – machos de *N. ablephara*

Abundance

Poros pré-cloacais – machos de *C. leiolepis*

Abundance

Poros pré-cloacais – machos de *N. ablephara*

Abundance