



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL

Efeito da urbanização sobre assimetria das asas de Jataí (*Tetragonisca angustula* - Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

Ana Paula Valdez Andreazzi

Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal. Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Rodrigo Aranda

Campo Grande, MS

Novembro, 2023

Dedico esse trabalho a todos que contribuíram e me apoiaram ao longo desta pesquisa, foram fundamentais para a realização deste estudo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e as pessoas incríveis que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Em especial, dedico meu agradecimento à minha mãe, seu amor incondicional e apoio foram a bússola que guiou meus sonhos.

Aos meus grandes amigos, meu agradecimento sincero por me apoiarem, tanto na jornada acadêmica quanto nas aventuras da vida. Agradeço à Carolina, minha amiga desde a graduação, que esteve sempre presente, me acompanhando, oferecendo conselhos e motivação, celebrando cada pequena vitória. Agradeço também ao João Emílio (Nuno), pela sua presença constante, compreensão e incentivo em todos os momentos em que precisei. Seu apoio foi fundamental para cada conquista.

Agradeço ao meu orientador, Rodrigo Aranda, por sua orientação, parceria em todos os momentos, sempre me apoiando e compartilhando seus ricos conhecimentos ao longo desta jornada acadêmica. Sua contribuição foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada por tudo.

Aos meus professores e colegas de profissão, que contribuíram imensamente com seus conhecimentos científicos, não estaria aqui sem o aprendizado que me proporcionaram. Aos excelentes professores que despertaram meu interesse pelas abelhas e me apoiaram ao longo da graduação e agora do mestrado, não tenho palavras para expressar minha gratidão e admiração por vocês.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS pelo apoio e infraestrutura oferecidos.

Índice

Resumo	5
Abstract	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MÉTODOS	10
2.1 Área de estudo.....	10
2.2 Coletas e Tratamentos do material biológico.....	11
2.3 Morfometria Geométrica	12
2.4 Análises de dados.....	13
3. RESULTADOS	14
3.1 Assimetria	14
3.2 Morfologia das asas	16
3.3 Variações nos Marcos anatômicos.....	16
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÕES	16
6. REFERÊNCIAS	21

Resumo: As abelhas *Tetragonisca angustula* são amplamente distribuídas no Brasil, sendo indicadoras cruciais de qualidade e preservação ambiental. A capacidade de adaptação dessas abelhas a ambientes urbanos não elimina os possíveis impactos negativos da urbanização. A presença de *Tetragonisca angustula* em áreas urbanas pode sugerir respostas na morfologia e assimetria das asas, relacionados à influência humana como efeitos de alteração na paisagem, temperatura e diversidade de plantas. Métodos morfométricos e análises estatísticas são ferramentas cruciais para entender as variações morfológicas. Este estudo visa investigar os efeitos ambientais na assimetria das asas de abelhas *T. angustula* ao longo de um gradiente urbano, esperando-se um aumento da assimetria em ambientes urbanizados desfavoráveis, bem como as variações na morfometria geométrica das asas, indicando se ocorrem, em que local e em qual intensidade. Avaliamos três locais distintos, sendo uma zona urbana, uma região natural suburbana e uma área natural rural. Utilizando morfometria geométrica, analisamos 160 indivíduos, 320 asas e 8 marcos anatômicos por asa. Os marcos anatômicos foram transformados através da técnica *procrustes* e calculado o grau de assimetria para cada asa, considerando-se a diferença da média dos marcos anatômicos. Para comparação entre as três áreas, foi realizada análise de variância. Para estabelecer as variações morfométricas, foi utilizado análise de componentes principais, análise de variância multivariada para comparação entre as áreas e placas de deformações em relação aos centroides de cada marco anatômico. Os resultados revelaram padrões diferentes de assimetria, corroborando a hipótese de que a área urbana produz maior assimetria nas asas de *T. angustula* em relação às duas outras áreas. Ainda, a urbanização afeta de forma mais pronunciada a posição dos marcos anatômicos das asas, indicando possíveis influências de recursos alimentares, temperatura e pressões ecológicas nessas variações.

Palavras-chave: Abelha nativa, Assimetria flutuante, Morfometria geométrica.

Abstract: *Tetragonisca angustula* bees are widely distributed throughout Brazil and are crucial indicators of environmental quality and preservation. Despite their adaptive capacity to urban environments, these bees still face potential negative impacts of urbanization. The presence of *T. angustula* in urban areas may produce effects in wing morphology and asymmetry due to human influence, such as alterations in landscape, temperature, and plant diversity. Morphometrical methods and statistical analyses are crucial tools in comprehending these morphological variations. This study aims to investigate the environmental effects on wing asymmetry in *T. angustula* bees along an urban gradient, expecting an increase in asymmetry in unfavorable urbanized environments, as well as variations in wings geometric morphometrics, determining if it occurs, in which places and in what extension. We evaluated three distinct locations: an urban zone, a suburban natural region, and a rural natural area. Employing geometric morphometrics, we analyzed 160 individuals, 320 wings, and 8 anatomical landmarks per wing. The anatomical landmarks were transformed using the Procrustes technique, and the degree of asymmetry for each wing was calculated considering the difference in the mean of the anatomical landmarks. For comparison among the three areas, an analysis of variance was conducted. To establish the morphometric variations, principal component analysis was used, along with multivariate analysis of variance for comparison between areas, and deformation grids concerning the centroids of each anatomical landmark. The results unveiled different asymmetry patterns, supporting the hypothesis that urban areas are more asymmetric compared to the other two areas, and that urbanization more profoundly affects the wing morphometrics of the species' anatomical landmarks, indicating possible influences of food resources, temperature, and ecological pressures in these variations.

Keywords: Native bee, Fluctuating asymmetry, Geometric morphometrics

1. INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como Jataí, a *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) tem ampla distribuição no Brasil, estendendo-se do Sul do Brasil até o México (NOGUEIRA-NETO, 1970; WITTER e BLOCHTEIN, 2009). Apesar dessa extensa área de ocorrência, a espécie demonstra seletividade tanto na obtenção de recursos alimentares quanto na escolha de abrigos (WITTER e BLOCHTEIN, 2009). É uma abelha pequena, com aproximadamente 5 mm de comprimento, exibindo uma coloração amarelo-ouro no tegumento e corbículas pretas (Fig.1) e não possuindo ferrão desenvolvido (WITTER e BLOCHTEIN, 2009). Essas abelhas se destacam por terem uma entrada de ninho em formato de tubo, construída com cerume mole, com uma parede fina contendo pequenos orifícios (NOGUEIRA-NETO, 1970). Demonstram comportamento defensivo pouco agressivo, manifestado por leves beliscões ou aplicação de cerume em intrusos quando percebem ameaças. Essa adaptação evolutiva possibilita a criação próxima a residências, seres humanos e animais sem representar riscos de ataques (NOGUEIRA-NETO, 1970).



Figura 1. - Vista lateral da fêmea de Jataí, *Tetragonisca angustula*.

A espécie *T. angustula* é uma das mais adaptáveis em relação ao hábito de nidificação, com capacidade de nidificar em diferentes substratos (BRAGA *et al.* 2012), o que a torna adaptável e abundante em áreas perturbadas, nas quais pode utilizar os mais variados substratos, desde cavidades em tronco de árvores, blocos de concreto, paredes e cavidades superficiais. Este comportamento provavelmente promoveu sua adaptação ao ambiente urbano (NOGUEIRA-NETO, 1970; AIDAR, 1999; WITTER e BLOCHTEIN, 2009).

Essas abelhas têm hábitos alimentares generalistas e desempenham um papel importante na polinização da flora tropical. Além disso, *T. angustula* também é utilizada tanto na produção de mel

como na polinização de culturas (BRAGA *et al.* 2012), características que destacam sua importância como agentes ecológicos. Compreender seus padrões de uso de recursos, como nidificação, plantas com as quais interagem e os efeitos da mudança da paisagem é fundamental para promover sua conservação e garantir a manutenção da biodiversidade em ecossistemas tropicais (BRAGA *et al.* 2012).

De acordo com Rundlöf *et al.* (2015), o intenso desenvolvimento da agricultura e da produção animal tem gerado preocupações em relação à exposição das abelhas a substâncias com as quais elas não estavam anteriormente em contato. O aumento da demanda por alimentos tem levado os agricultores a utilizar maiores quantidades de fertilizantes minerais e pesticidas, resultando na presença de resíduos destes como contaminantes. Hoje se sabe que a urbanização também possui efeitos negativos na preservação das abelhas. A perda de habitat devido à expansão urbana, a escassez de recursos alimentares, os diversos usos do solo, a poluição do ar e a introdução de espécies invasoras são alguns dos efeitos negativos enfrentados pelas abelhas urbanas (MIGDAŁ *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm identificado fatores que podem desencadear prejuízos às populações de abelhas em áreas urbanas. (FREITAS *et al.*, 2007; BANASZAK-CIBICKA *et al.*, 2018; BIRDSHIRE, *et al.*, 2020; ARANDA 2021). Esses fatores incluem alteração e intensificação no uso do solo, mudanças climáticas, aplicação de pesticidas, escassez de alimentos e recursos de nidificação. Esses elementos exercem um impacto negativo sobre a saúde e a sobrevivência das abelhas, representando desafios significativos para a conservação desses importantes polinizadores (MIGDAŁ *et al.*, 2018; BIRDSHIRE, *et al.*, 2020).

A ocorrência e abundância das espécies em áreas urbanas são influenciadas pela disponibilidade de recursos, principalmente abrigo e alimento (FREITAS *et al.*, 2007). Uma das consequências da urbanização é a extinção em massa de espécies justamente pela diminuição da cobertura de vegetação natural e substituição do uso do solo por edificações (HOFFMANN *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2015). A presença de abelhas em áreas urbanas, as expõem à interações diretas e indiretas com as alterações humanas, trazendo preocupações do ponto de vista biológico em relação ao quanto isso pode prejudicá-las. A escassez de recursos naturais pode ocasionar um declínio de sua diversidade, contribuindo para a redução das abelhas no panorama urbano (HOSTETLER e MCINTYRE 2001; BANASZAK-CIBICKA *et al.*, 2018; PEIL e ARANDA 2021; NUNES *et al.*, 2015).

As construções humanas, arborização urbana e o conjunto de espécies sinantrópicas fornecem alguns recursos necessários para atrair e manter diversas espécies de abelhas, pois elas se fazem presentes nesse meio (AIDAR, 1999). Algumas evidências até afirmam que locais antropizados podem favorecer a conservação das abelhas, embora também possam gerar impactos negativos para as mesmas. Inclusive, algumas mudanças morfológicas podem ocorrer, como condições

adversas devido a fatores estressantes (NUNES *et al*, 2015; BANASZAK-CIBICKA *et al*, 2018; HELM *et al*, 2021).

A simetria bilateral é uma característica que permite distinguir um lado direito de um lado esquerdo em um plano corporal, em que ambos os lados são imagens espelhadas um do outro. Essa simetria é resultado do desenvolvimento de ambos os lados a partir do mesmo conjunto de genes. No entanto, a detecção de assimetria na forma de estruturas ou organismos indica a presença de fatores ou condições que afetam a estabilidade do desenvolvimento (BENÍTEZ *et al*. 2020). A assimetria observada é uma consequência de processos biológicos, embora a inferência desses processos a partir dos padrões de assimetria seja complexa e geralmente exija evidências adicionais (BENÍTEZ *et al*. 2020). A simetria bilateral é característica em insetos, incluindo as abelhas, onde variações podem ser indicadores de estresse ecossistêmicos, pois é de esperar-se que a assimetria aumente quando as condições ambientais não são favoráveis para aquele espécime (HOFFMANN *et al*, 2005; NUNES *et al*, 2015; BANASZAK-CIBICKA; *et al*, 2018; BENÍTEZ *et al*. 2020; HELM *et al*. 2021). Fatores urbanos que favorecem um aumento na assimetria incluem poluição do ar, da água, temperatura, deficiência alimentar e parasitismo (BANASZAK-CIBICKA; *et al*, 2018).

As abelhas urbanas vivem em um habitat diferente de sua área original de ocorrência e enfrentam diversos desafios em comparação com as que habitam em áreas naturais. Alterações na morfologia das asas pode refletir efeitos da urbanização, podendo também ser usado como indicador de condições ambientais. Alterações morfológicas podem ocorrer no desenvolvimento das abelhas pelo fato de envolver vários genes que atuam desde o ovo, até a metamorfose. Sendo assim, qualquer alteração no padrão espaço-temporal de expressão gênica durante o período larval do desenvolvimento pode refletir morfológicamente no indivíduo adulto (HOFFMANN, *et al*, 2005). Essa plasticidade fenotípica é essencial na adaptação do organismo a ambientes instáveis, devido ao fato de permitir a manutenção dinâmica do indivíduo (NUNES *et al*, 2015).

A morfometria geométrica é uma abordagem que permite analisar e quantificar variações morfológicas, entre elas assimetrias, fornecendo *insights* sobre os processos subjacentes ao desenvolvimento de estruturas. (DALY, 1985; BENÍTEZ *et al*. 2020; VACA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023). Insetos são bons modelos para análises biométricas por possuírem ciclo de vida relativamente rápido e seu modo de vida se reflete nas dimensões e formas pelo crescimento larval e metamorfose (HELM *et al*, 2021). Além disso, as medidas morfométricas podem ser facilmente obtidas e apresentar resultados precisos (MASAQUIZA *et al*. 2023). Segundo Daly (1985), a morfometria permite encerrar dados morfológicos num conjunto de dados numéricos e gráficos, com o propósito de expressar e testar relações hipotéticas, sendo que as técnicas de análise multivariada são utilizadas para examinar estas relações.

Compreender os impactos da urbanização sobre a morfologia das asas é crucial para desenvolver estratégias de conservação adequadas, garantindo a sobrevivência desses importantes polinizadores e a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas urbanos (BENÍTEZ *et al*. 2020). Como

as abelhas são sensíveis às variações ambientais, como a oferta dos recursos florais para alimentação e locais para nidificação, modificações na abundância e composição desses recursos podem ser fatores cruciais na determinação do tamanho do corpo e da morfologia das asas das abelhas (CHOLE et al., 2019).

Tendo em vista esses fatores, este estudo tem como objetivo avaliar a morfologia e a assimetria das asas da espécie *T. angustula*, investigando sua possível variação em resposta à urbanização em diferentes ambientes. Procuramos identificar mudanças na assimetria das asas de espécimes entre áreas urbanas e rurais, evidenciando os possíveis impactos da urbanização sobre o desenvolvimento das abelhas nativas. Nossa hipótese inicial é de que há maior assimetria nas asas das abelhas de áreas urbanas, em função de um maior estresse.

2. MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

O estudo foi realizado no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. As áreas de estudo, compreendidas dentro do Cerrado, foram selecionadas e categorizadas em: área urbana, área natural urbana e área rural (Fig. 2A-E). A área rural está localizada em uma fazenda no município de Ribas do Rio Pardo (Fig. 2B – 21°4'15.60"S, 53°41'11.64"W), sendo a propriedade caracterizada por apresentar estágios sucessionais da vegetação do Cerrado, incluindo áreas destinadas à pecuária, áreas de regeneração intermediária, nas quais não houve gado nos últimos 10 anos, e áreas preservadas compostas por vegetação nativa, sendo uma delas uma reserva legal.

As áreas urbanas encontram-se no município de Campo Grande (Fig. 2C). A área natural urbana trata-se de um parque denominado "Parque das Nações Indígenas" (Fig. 2D - 20°27'84"S, 54°34'26"W), ocupando uma área de 1.163.876,98 m², que apresenta infraestrutura de lazer e esporte às margens de um lago formado pelas nascentes do córrego Prosa. A reserva possui uma vegetação formada por gramíneas e árvores ornamentais originárias do seu projeto de paisagismo, contendo espécies do Cerrado brasileiro. Também faz fronteira direta com o Parque Estadual do Prosa, aumentando sua área contínua de vegetação nativa.

A área urbana está localizada dentro da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) (Fig. 2E - 20°30'11.67"S, 54°36'40.77"W). Dentro do campus Universitário há manchas de vegetação nativa, bem como um lago abastecido pelos córregos Cabaça e Bandeira, que formam a bacia do Bandeira, parte integrante da bacia do Rio Paraná. O entorno da região é predominantemente residencial, com adensamento urbano considerável.

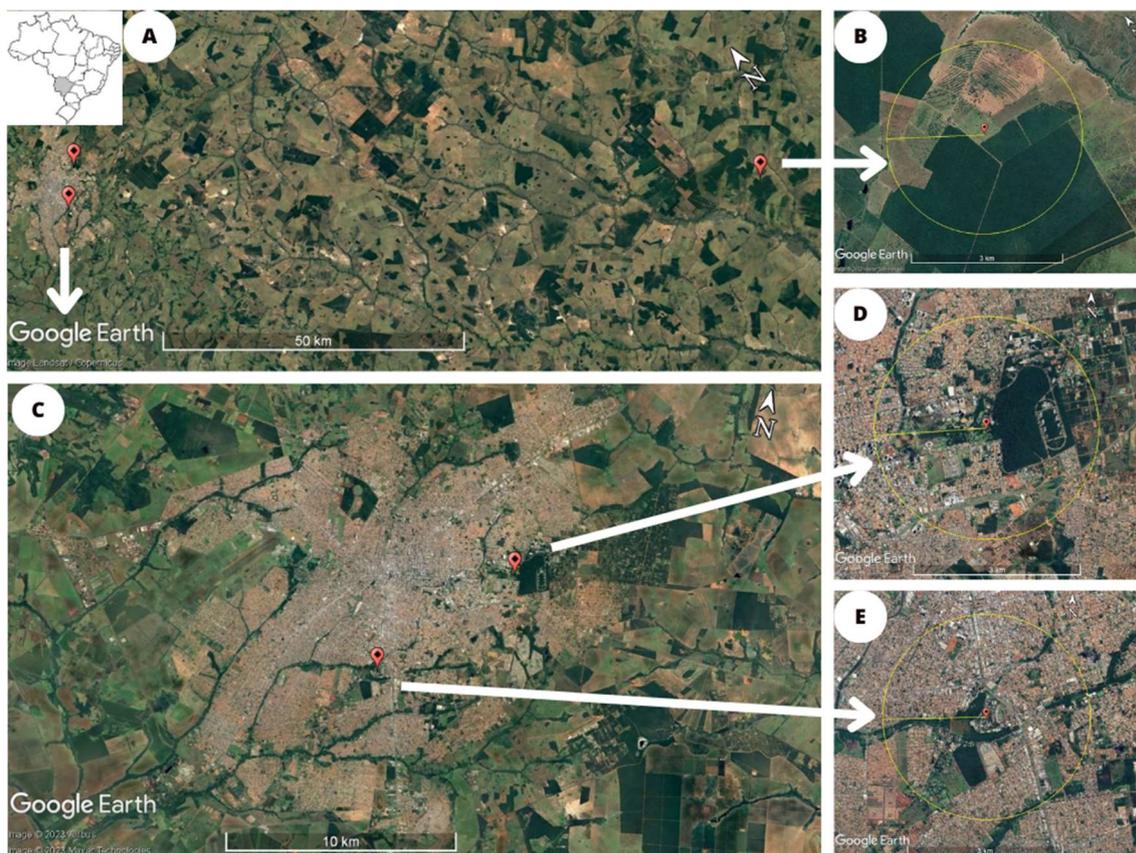


Figura 2. (A) Mapa das áreas de estudo, com os locais de amostragens indicados pelos pontos vermelhos. As três áreas de estudos: (B) Área rural, localizada na Fazenda em Ribas do Rio Pardo/MS; (C) Áreas Natural Urbana e Urbana, em Campo Grande/MS; (D) Área suburbana do Parque das Nações Indígenas e (E) Área urbana da Cidade Universitária na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

2.2 Coletas e Tratamentos do material biológico

Operárias de *T. angustula* foram coletadas nas três áreas de estudo, entre os meses de novembro de 2021 e março de 2022, que corresponde a época do ano em que as abelhas estão mais ativas, devido à maior disponibilidade de recursos. Com isso, as abelhas percorrerem distâncias maiores e exploraram uma área de forrageamento maior em comparação com outras épocas do ano (COUVILLON *et al*, 2014).

A amostragem na zona rural foi realizada no mês de novembro de 2021, através de coleta ativa dos indivíduos entre as 9 horas e 16 horas. Nas áreas urbanas, as coletas foram realizadas de dezembro de 2021 a março de 2022. No Parque das Nações Indígenas, as coletas foram realizadas entre as 9 e 15 horas. Já na cidade Universitária, para evitar pseudorréplicas de amostragem em apenas um ninho, foram coletados em torno de 5 indivíduos por ninho, em ao menos 10 ninhos previamente identificados ao longo do campus, entre as 09 e 16 horas.

Para capturá-las, foi utilizado sugador entomológico, construído com tubo Falcon de 50 mL com dois furos em sua tampa, para a passagem da mangueira de sucção de silicone. No fim de cada coleta, uma pequena quantidade de algodão com éter foi inserida dentro do tubo para adormecê-las e consequentemente facilitar o manuseio. Em seguida, os espécimes foram transferidos para um

frasco de armazenamento, com álcool 90% para a preservação e transporte para o laboratório, onde a identificação de espécie foi confirmada para todos os indivíduos coletados. As coletas foram de no 53 indivíduos na área urbana e área natural e 54 na área urbana, gerando um total de 160 indivíduos e 320 amostras de asas para a análise (considerando a asa esquerda e direita anterior). As coletas foram autorizadas pela licença permanente para coleta de material biológico MMA-ICMBio-SISBIO nº 61938-1 - Código de autenticação: 86896465.

2.3 Morfometria Geométrica

Para as análises da morfometria geométrica, os 160 espécimes tiveram as asas anteriores (direita e esquerda) retiradas com o auxílio de tesoura e pinça, transferidas para lâminas histológicas com as lamínulas sobrepostas e seladas com esmalte incolor. Em cada lâmina foram dispostas 10 asas (5 pares), de espécimes do mesmo local de coleta. A asa anterior é utilizada como protocolo para comparações em Hymenoptera. (TÜZÜN, A. 2009). Ao finalizar essa etapa, as asas foram fotografadas em estereomicroscópio com câmera acoplada, modelo Stereo Discovery V.20 (Zeiss), com auxílio do software ZEN lite 2011 (Zeiss) para captura das imagens em escalas padronizadas.

As análises morfométricas foram baseadas na verificação da ocorrência de variações na posição de marcos anatômicos (*landmarks*) do padrão de venação das asas entre os indivíduos das três áreas em estudo (Fig. 3). Foi usada a metodologia descrita por Francoy *et al* (2012) para o processamento de imagens. Após a captura de imagens das lâminas, foram adicionadas escalas em todas as fotos, cujos arquivos foram salvos em dois formatos: TIFF e JPEG. Em cada asa dos espécimes de *T. angustula* foram plotados oito marcos anatômicos, na intersecção das venações, definidos em cada asa como coordenadas posicionais em um plano cartesiano (X e Y). Os pontos foram numerados de acordo com sua distribuição ao longo das intersecções das células (FRANCOY *et al.* 2012).

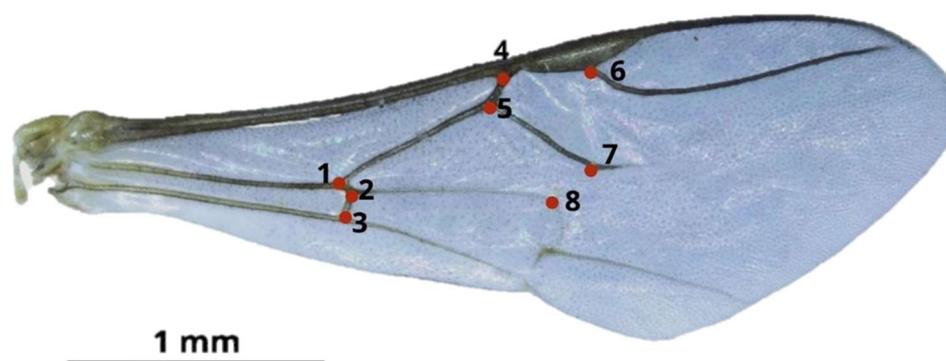


Figura 3. Marcos anatômicos (*landmarks* - pontos vermelhos) utilizados para análise do tamanho e da forma da asa anterior (na imagem asa direita) de *Tetragonisca angustula*.

2.4 Análises de dados

Os marcos anatômicos foram digitalizados utilizando o software ImageJ, desenvolvido por Wayne Rasband em 1987 (Hannickel et al., 2012). Uma vez definidos os marcos, foi realizado o espelhamento da imagem das asas esquerdas para comparação com as asas direitas e avaliação da assimetria. Os valores provenientes das imagens foram tratados através do alinhamento *Procrustes*, uma técnica que ajusta o tamanho das asas através da deformação da imagem e alinhamento dos marcos anatômicos. Para tanto, foram realizadas as transformações de escala, translação e rotação, padronizando os marcos anatômicos em todas as asas em relação aos seus centróides (ROHLF e MARCUS, 1993). Dessa forma, elimina-se o efeito do tamanho das estruturas e a análise concentra-se nas variações de forma. Tal alinhamento e rotação foi realizado com os valores de todos os pontos de intersecção no programa PAST® Versão 4.13 (HAMMER e HARPER, 2001).

A diferença entre as medidas do lado esquerdo e direito de cada marco foi calculada e denominada “Grau de assimetria” (esquerda-direita = assimetria). A assimetria é negativa (asa do lado direito maior) ou positiva (asa do lado esquerdo maior) ou inexistente, quando as asas direita e esquerda são simétricas (zero significa simetria perfeita). Para cada marco anatômico foi calculado a assimetria do dado transformado por *Procrustes* (esquerda-direita), sendo escalonado em 100 (valor do *landmark* esquerdo - valor do *landmark* direito x 100) (KLINGENBERG *et al*, 1998). O grau de assimetria da asa foi calculado pela média de todos os marcos anatômicos por indivíduos, como proposto por Klingenberg *et al* (1998). Os valores médios de assimetria das asas entre as áreas foram comparados por análise de variância (ANOVA), uma vez que os dados possuem distribuição normal.

Também foram realizadas análises para verificar se há variação na forma geral das asas de espécimes da mesma área e entre os oriundos das três áreas. Para comparação da morfometria geométrica, foram utilizados os dados transformados por *Procrustes* apenas das asas direitas das três áreas, de todos os indivíduos. Foi realizada análise de componentes principais (PCA) para verificar quais e quanto da variância é explicada por cada componente principal (marcos anatômicos). Cada componente possui um *eigenvalue* associado, que indica a proporção da variância total dos dados que é capturada por esse componente. Para testar a diferença significativa da morfometria geométrica entre cada uma das áreas, foi utilizado o teste de análise de variância multivariada (MANOVA) para testar os dados e analisar diferenças entre grupos (áreas) em múltiplas variáveis dependentes (marcos anatômicos). A partir dos resultados foi elaborada uma placa de deformação (*Thin Plate Spline Deformation* - TPS), onde os valores nos de deformação representam as magnitudes e direções das deformações locais que ocorreram durante o processo de transformação por TPS a partir do centróide. Eles são desenhados a partir dos pontos de referência originais e estendidos na direção da deformação. Durante essa deformação, ocorrem mudanças nas formas

originais dos objetos, e os valores nos *Principal Strains* descrevem essas alterações. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software livre PAST® 4.13.

3. RESULTADOS

3.1 Assimetria

Podemos observar que as diferenças da assimetria das asas entre as áreas foram significativas ($F=23,38$, $p<0,001$), sendo que a área rural e a área natural urbana não possuem diferença significativa ($p=0,93$). Por outro lado, a área urbana difere significativamente das demais ($p<0,001$) (Fig. 4). A linha horizontal (0,0) é a referência para determinação do grau de assimetria: quanto mais próxima a essa linha, mais simétricas (ou menos assimétricas) são as asas. As curvas em forma de violino em cada *bloxpot* representam a quantidade de indivíduos e a concentração dos mesmos em cada área. Os desvios padrão fornecem uma medida da dispersão dos dados em torno das médias, permitindo uma compreensão da variabilidade morfológica dentro de cada área. Desta forma, observamos que há uma concentração maior de indivíduos com assimetria na área urbanizada, enquanto na área natural e na área natural urbana, as maiores concentrações tendem a ficar mais próximas da linha de simetria.

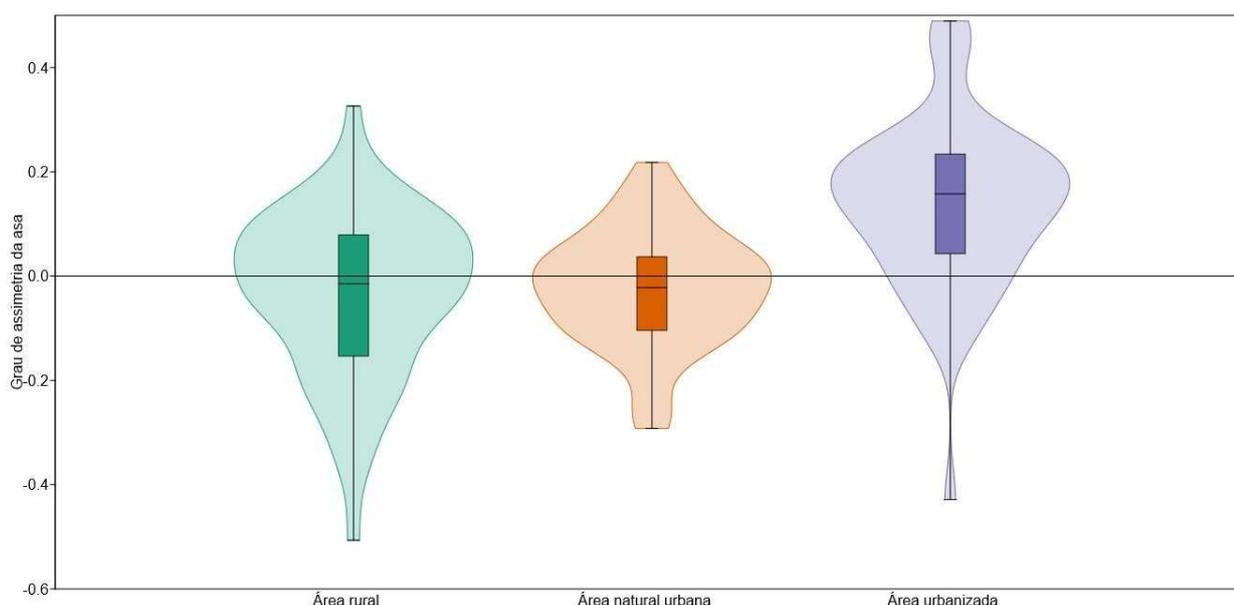


Figura 4. Grau de assimetria das asas de *Tetragonisca angustula* em comparação aos graus de urbanização.

3.2 Morfologia das asas

Observamos diferenças na posição dos marcos anatômicos das asas ao longo das áreas de estudo (Fig. 5A). No gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA), os segmentos verde escuro, verde claro e cinza representam as áreas rurais, urbanas seminaturais e urbanas densamente habitadas, respectivamente. Os vetores exibidos no gráfico PCA representam as coordenadas X e Y de cada marco, fornecendo informações sobre as posições mais influentes no

plano cartesiano, demonstrando onde ocorreram as variações mais substanciais na separação dos grupos. Os valores de *Eigenvalue*, derivados da PCA, indicam a quantidade de variância explicada por cada componente principal. Quanto maior o *Eigenvalue* de um componente principal, mais informações são encapsuladas nele. A magnitude e o sinal (positivo ou negativo) das cargas, que são vetores que representam contribuições marcantes para os componentes principais, desempenharam um papel significativo na interpretação dos resultados da PCA. A magnitude ressaltou a força da relação entre um marco específico e o componente principal, com magnitudes maiores indicando contribuições mais substanciais. O sinal de carregamentos indicava a direção dessa associação. Os vetores revelam a direção e a magnitude da carga em relação ao componente principal (Fig. 5B). Essa representação visual facilitou a interpretação das associações entre pontos de referência e componentes principais.

Para verificar a significância das variações entre as áreas de coleta, foi utilizada a MANOVA. Esse teste paramétrico baseia-se em suposições de que os dados seguem uma distribuição normal multivariada e que as variâncias e covariâncias são iguais entre os grupos. A MANOVA revelou diferenças significativas na assimetria alar entre as populações rural e urbana de *T. angustula* (Pillai's trace = 0,61; $F=4,53$, $p<0,01$). Especificamente, as abelhas do ambiente urbano foram altamente modificadas exibindo maior variação nas asas do que aquelas das áreas rurais menos impactadas pelo homem.

A significância estatística da MANOVA justificou testes *post hoc*, particularmente o teste de Bonferroni, para determinar as diferenças específicas dos grupos. Embora não houvesse distinção entre as duas áreas urbanas ($p= 0,18$), a área rural diferiu significativamente da área natural urbana ($p<0,01$) e da área urbana ($p<0,01$). Conseqüentemente, os resultados sugerem que, além da assimetria observada, as mudanças morfológicas na estrutura da asa foram mais aparentes do que se pensava anteriormente.

3.3 Variações nos Marcos anatômicos

Após a Análise de Componentes Principais (PCA), ficam evidentes no gráfico de deformação (Fig. 5C) os efeitos das variações dos *landmarks* nas asas, em função da posição dos centroides. Os gráficos de deformação TPS ilustram a magnitude e as transformações dos pontos de referência. Os vetores de direção e magnitude (x) dentro dessas imagens indicam mudanças específicas. A direção exata da variação é delineada, ilustrando onde ocorreram alterações. As cores quentes (como vermelho) são usadas para representar regiões onde ocorreu um aumento na extensão (alongamento), enquanto cores frias (como azul) podem ser usadas para indicar regiões em que houve uma diminuição na extensão (encurtamento) em relação aos centroides. A análise das deformações no contexto rural (Fig. 5D) revelam uma variação mínima, evidenciada por uma predominância de regiões de tonalidades mais frias no gráfico. Especificamente, ao observarmos o marco 6, notamos uma maior variação na posição dos pontos anatômicos em várias áreas nessa região da asa.

O padrão distinto de deformação observado no ambiente natural urbano (Fig. 5E), caracterizado por cores quentes proeminentes, indicando maiores variações em pontos específicos em relação à área rural. Na zona urbana (Fig. 5F), notamos uma expressiva variação nas deformações alares, onde tons mais quentes preponderam, indicando maior dinamismo.

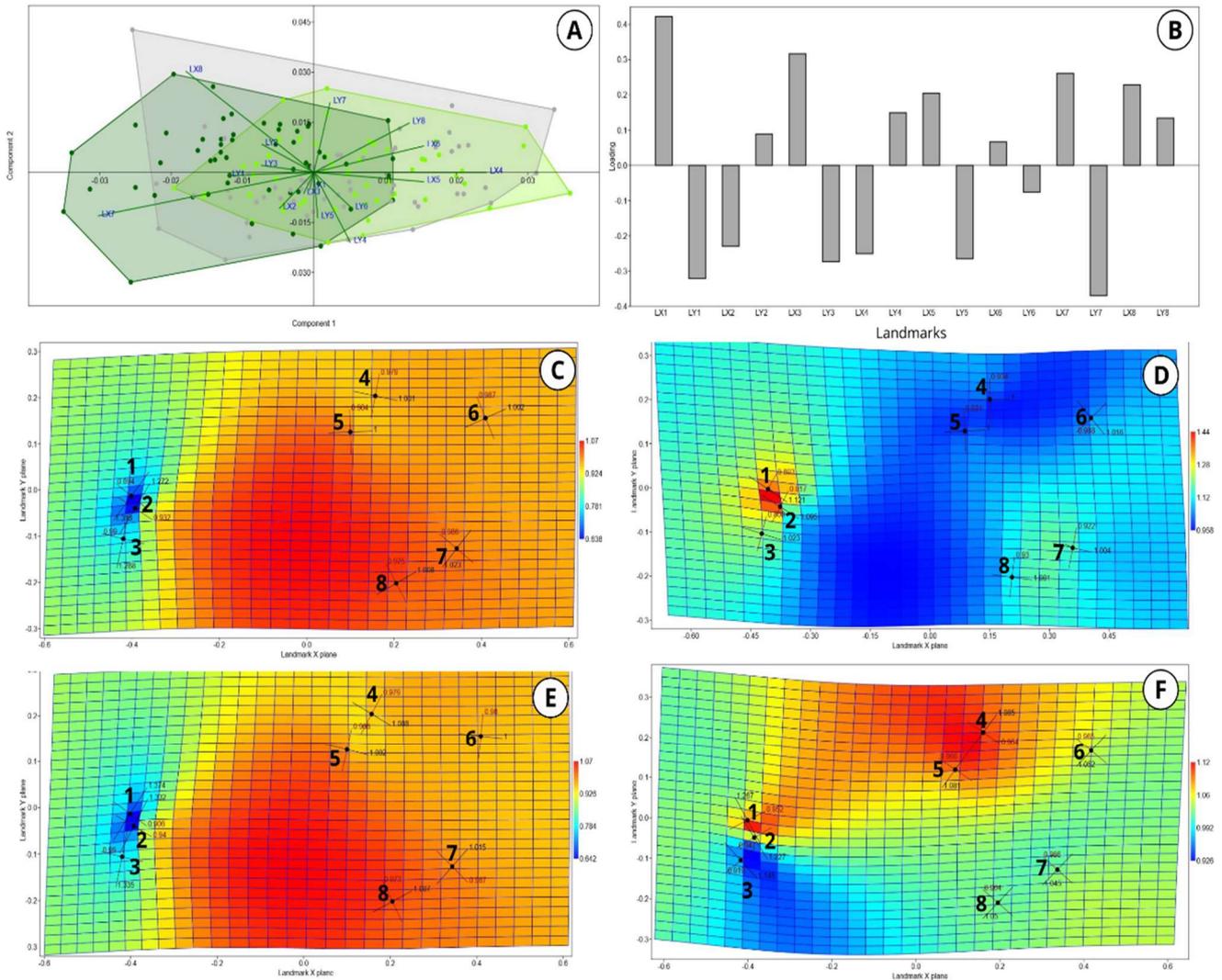


Figura 5. Resultado da análise de componentes principais (PCA). (A) valores dos vetores que representam a direção e magnitude das contribuições de cada landmark. (B) variação morfométrica das asas de *Tetragonisca angustula* em comparação aos três pontos de coletas: Área rural (verde escuro), área natural-urbana (verde claro) e área urbanizada (cinza). (C) – Ilustração da placa de deformação demonstrando a totalidade da deformação dos pontos de referência em todos os locais; (D) - Deformação da área rural; (E)-Deformação da área natural-urbana; (F) – Deformação da área urbana.

4. DISCUSSÃO

Com base nas análises de assimetria foi observado que as asas apresentaram variações de acordo com o local de coleta (Fig. 4). As operárias da área urbanizadas se destacam pela maior

assimetria em suas asas, com grandes variações nos valores dos marcos anatômicos, apesar das demais áreas também apresentarem alterações nos valores dos dois lados das asas. Ao examinar a variação no grau de assimetria (Fig. 4), observa-se que na área rural, há uma menor variação do grau de assimetria em relação à linha de referência (0.0), em comparação com a área natural urbana e a área completamente urbana. Na área natural urbana, observou-se um maior número de indivíduos com maior assimetria em comparação com a área rural, com uma distância um pouco maior em relação à linha de referência. A comparação entre a área rural e a área natural não apresentou diferença significativa, sugerindo que os graus de assimetria nessas duas áreas são semelhantes. Por outro lado, a área urbanizada apresentou uma clara discrepância em relação ao padrão considerado simétrico, com um maior número de indivíduos exibindo assimetria nas asas. Isso indica que o ambiente urbano influencia os graus de assimetria das asas resultando em deformações mais pronunciadas nessa população de abelhas urbanas.

Os métodos empregados oferecem uma abordagem quantitativa para avaliar a assimetria e a variação morfológica, permitindo a análise do impacto das condições ambientais no desenvolvimento simétrico ou assimétrico. A assimetria flutuante (AF) é amplamente utilizada como medida fenotípica para avaliar a resposta de organismos ao estresse ambiental, sendo explorada como biomarcador em estudos anteriores (KLINGENBERG et al. 1998; BENÍTEZ et al. 2020; MASAQUIZA et al. 2023). Ela refere-se à variabilidade natural nas características simétricas de um organismo ao longo do tempo, muitas vezes em resposta a mudanças nas condições ambientais. No contexto das asas de abelhas, a AF se manifesta quando há variações nas características morfológicas entre o lado direito e esquerdo das asas em uma população, mesmo em condições consideradas normais. Isso é chamado de flutuação porque as diferenças podem variar ao longo do tempo, refletindo respostas adaptativas a mudanças ambientais, fatores genéticos ou outras influências. Paralelamente, métodos de morfometria geométrica emergiram como alternativa para quantificar a variação na forma e investigar os efeitos do estresse na assimetria flutuante (BENÍTEZ et al. 2020; MASAQUIZA et al. 2023). A assimetria flutuante, empregada como indicador de estresse ambiental, evidencia a constante exposição dos organismos a um ambiente dinâmico, abarcando variações na dieta, temperatura, competição e outros fatores (BENÍTEZ et al. 2020).

Portanto, pode-se inferir que a urbanização exerceu um impacto mais significativo nas alterações da assimetria das asas em comparação com a área rural. Isso sugere que esses níveis de estresse causados por fatores ambientais da urbanização podem refletir na assimetria das asas em comparação com áreas naturais, na qual pode ser atribuída a vários processos fisiológicos durante o desenvolvimento devido à quantidade, tipo e disponibilidade de recursos utilizados pelas abelhas que podem impactar adversamente o desenvolvimento simétrico das asas.

Esses resultados ressaltam a influência do ambiente urbano na morfologia das asas de *T. angustula* e a importância de considerar o contexto ambiental ao analisar características morfológicas em populações de abelhas (NUNES et al., 2015).

A expressão de características morfológicas simétricas nos organismos pode desviar devido a restrições genômicas, ambientais ou ambas. Esses desvios ocorrem devido à natureza inadequada dos processos de desenvolvimento, que possuem um componente aleatório. O ambiente desempenha um papel importante na adaptação dos organismos, sendo que o estresse ambiental pode aumentar as assimetrias (NUNES *et al.*, 2015; BANASZAK-CIBICKA, 2018; HELM *et al.*, 2021; VACA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023). Condições relacionadas à produção agrícola, como estresse nutricional, temperaturas extremas, poluição química e densidades populacionais, podem causar estresse durante o desenvolvimento, levando a um aumento da assimetria flutuante presente nas asas de abelhas (BENÍTEZ *et al.* 2020; VACA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023).

Considerando os fatores que podem influenciar a morfologia das abelhas, a dieta das abelhas Jataí é um aspecto crucial a ser considerado. Uma nutrição inadequada durante o desenvolvimento larval, ocasionada pela escassez de alimentos ou a qualidade de recursos alimentares, pode conduzir à níveis de estresse que afetarão a formação das asas na metamorfose, afetando a simetria das asas (FREITAS *et al.*, 2007; VACA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023). Similarmente, a correlação entre assimetria e a nutrição foi explorada em estudos anteriores com borboletas. Segundo Brakefield (1997), o estresse alimentar, tanto durante o desenvolvimento larval quanto na fase adulta, resultou em assimetria das asas da espécie de borboleta *Bicyclus anynana* e, conseqüentemente, comprometeu o desempenho de voo, apesar de algumas adaptações nos recursos somáticos.

Avaliando as áreas de modificações e suas intensidades através das placas de deformações, podemos observar mudanças morfológicas distintas nas asas, de acordo com cada área de coleta (Fig.5). A área urbana foi onde a diferença foi implicitamente visível, em contraste com a área rural, pois teve maior alteração na magnitude, nas placas de deformação. Essa diferença pode ser atribuída à escassez e diversidade de recursos disponíveis ao longo do ano neste habitat, já que esse é um fator de grande impacto na nutrição das abelhas (VAUDO *et al.* 2015). A área urbana apresenta uma disponibilidade dinâmica e flutuante desses recursos, em contraste com o ambiente rural, onde a disponibilidade de recursos externos como pólen e néctar permanece consistente durante todo o ano (WARREN *et al.* 2020). Esse contraste implica que, mesmo com fatores como alimento e temperatura constantes, a morfologia das asas estava se transformando devido à exposição a um ambiente contrastante.

Além da maior assimetria no ambiente urbano, a morfologia das asas foi afetada, indicando que mesmo um cenário urbano relativamente pequeno influencia substancialmente a forma das asas. Essa singularidade no padrão de deformação é possivelmente influenciada por fatores ambientais que levam ao estresse as abelhas, sendo eles: pressões seletivas, presença de agrotóxicos, diversidade limitada de recursos alimentares e temperaturas acentuadas, já que são fatores ambientais importantes que pode afetar o desenvolvimento dos insetos, incluindo as abelhas (VACA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023; MOHAMMED, G. 2018; CHÁVEZ-GALARZA *et al.* 2013)

Outro mecanismo que poderia explicar os achados em relação aos níveis de assimetria, dimensões e alterações morfológicas das asas de *T. angustula* pode estar associado à variação na quantidade e qualidade dos recursos alimentares ao longo das distintas zonas de vegetação. De acordo com estudos desenvolvidos por Vaca-Sánchez (2023), há evidência que a alimentação das abelhas desempenha um papel significativo nas variações morfológicas, incluindo tamanho corporal e morfologia das asas. Destacam também que a qualidade do alimento e o comportamento de busca podem influenciar a assimetria das asas em abelhas (VACA-SÁNCHEZ, 2023).

Quezada-Euán (2011) observou que a qualidade inferior do alimento resultou em variações físicas morfológicas do corpo mais acentuadas. Além disso, a quantidade de alimento fornecido às larvas de operárias refletiu na diminuição ou aumento do tamanho dos indivíduos, revelando como esse polimorfismo determinado pelos recursos alimentares (QUEZADA-EUÁN, 2011).

Em um estudo relacionado, mudanças na quantidade e qualidade do alimento ao longo de um gradiente altitudinal foram identificadas como potenciais mecanismos explicativos para variações nos níveis de assimetria, tamanho e morfologia das asas de abelhas (VACA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023). Como as abelhas dependem de recursos florais para alimentação, modificações na abundância e composição desses recursos são fatores cruciais que determinam o tamanho do corpo e a morfologia das asas das abelhas (CHOLE *et al.* 2019). Essas descobertas destacam a complexidade e importância das interações entre alimentação, ambiente e características morfológicas em populações de abelhas, principalmente urbanas.

Essas descobertas corroboram com a ideia de que mudanças na morfologia das asas de abelhas podem estar relacionadas a fatores estressantes durante seus estágios larvais (WELLER e GANZHORN 2004). Essa mudança na forma e tamanho das asas influencia a capacidade de dispersão dos animais voadores, considerando que indivíduos mais simétricos tendem a ter mais sucesso devido à melhor aerodinâmica em comparação com os assimétricos (DE BLOCK *et al.* 2008).

As alterações na vegetação também podem impactar tanto a morfologia das asas quanto a assimetria flutuante nas venações das asas de *T. angustula*, como ilustrado, por exemplo, em estudos que indicam que em ambientes onde a qualidade do alimento é inferior, as variações morfológicas são mais acentuadas (QUEZADA-EUÁN *et al.*, 2011; CHOLE *et al.* 2019).

Nesse contexto, outro aspecto relevante nas áreas urbanas, é as abelhas ficam expostas a um maior estresse térmico. Por outro lado, áreas rurais com maior cobertura vegetal podem oferecer condições mais estáveis e menos extremas em termos de temperatura (XIONG *et al.*, 2019). A variação de temperatura entre áreas urbanas e rurais ou fatores climáticos relacionados à temperatura podem desempenhar um papel na alteração da morfologia das abelhas (MASAQUIZA *et al.*, 2023). Além disso, a inserção de colmeias no ambiente urbano pode influenciar as condições térmicas das abelhas e temperaturas mais elevadas podem levar a um maior estresse fisiológico, (THEODOROU , *et al.*, 2022), podendo refletir na assimetria das asas. Mesmo que as colônias

tenham uma boa capacidade de regulação térmica (STABENTHEINER *et al.*, 2021), com o aumento da urbanização e o agravamento da crise climática, essa capacidade de regulação pode não estar sendo mais tão eficiente (SÁNCHEZ-ECHEVERRÍA, *et al.*, 2019; THEODOROU, *et al.*, 2022).

Um estudo relacionado com o impacto da temperatura nos insetos de ZHANG *et al.* (2008) observou como em moscas-das-frutas sofreram alterações sobre a deterioração das habilidades cognitivas em resposta ao calor, onde teve implicações adversas na aptidão, impactando a capacidade do animal de assimilar novas informações, tomar decisões apropriadas e ajustar seu comportamento às condições variáveis dentro do ambiente (COOMES *et al.*, 2019). Em vista disso, Maxence (2022) investigou os efeitos do aquecimento global nas abelhas, especialmente durante episódios de calor intenso. As abelhas expostas a temperaturas elevadas (32°C) demonstraram uma redução significativa na formação de associações entre estímulos visuais e recompensas, assim como uma perda na capacidade de reter essas associações em curtos intervalos. Esses resultados indicam que o calor pode exercer efeitos prejudiciais dos insetos como as abelhas, contribuindo assim para o declínio populacional desses animais. O estudo ressalta a necessidade de compreender como as mudanças climáticas impactam não apenas a sua sobrevivência, mas também funções cognitivas cruciais para o comportamento ecológico das abelhas.

Além disso, a exposição a poluentes presentes na área urbana, é um dos contribuintes para alteração morfológica das abelhas e outros insetos bilateralmente simétricos e afetando também sua simetria (POQUET *et al.* 2015). As abelhas forrageiam a procura de alimento como néctar, água e pólen em grandes áreas, percorrendo até 4 km de distâncias de suas colmeias, em abelhas sem ferrão (RODRIGUES e RIBEIRO, 2014). A capacidade de forragear em larga escala, torna as abelhas muito mais suscetíveis à exposição a agentes tóxicos. Essa exposição a agentes tóxicos ocorre tanto por contato indireto, quando as abelhas coletam recursos contaminados, quanto por contato direto, quando forrageiam em áreas recém-aplicadas com agrotóxicos (MOHAMMED, G. 2018). Além disso, essas substâncias tóxicas podem permanecer armazenadas nas colmeias por longos períodos, até que sejam utilizadas pelas colônias. Esses fatores destacam a relevância de estudar os impactos dos agrotóxicos nas populações de abelhas e na ecologia de seus ambientes de forrageamento (LUNARDI, 2022).

A questão de se a assimetria é de fato um bom indicador de desenvolvimento ainda é objeto de debate, mas fica claro que é uma ferramenta essencial e eficaz para detecção desses padrões. É importante ressaltar que a assimetria nem sempre reflete todas as perturbações que um organismo pode ter experimentado. Portanto, é crucial identificá-las em um organismo e testar cuidadosamente as hipóteses relacionadas ao estresse populacional e à instabilidade do desenvolvimento, a fim de obter uma compreensão mais precisa desse fenômeno biológico (KLINGENBERG *et al.* 1998; BENÍTEZ *et al.* 2020) e como cada um dos fatores de estresse pode atuar sobre os organismos.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam os reais efeitos da urbanização na assimetria e morfologia das asas de *Tetragonisca angustula* e sugerem potenciais influências de fatores como disponibilidade de alimento, fenologia das plantas do Cerrado em ambiente urbano e possíveis efeitos climáticos, por exemplo. Enquanto o ambiente rural natural oferece acesso consistente a diversas fontes de alimentos ao longo do ano, o cenário urbano, com perfis de temperatura, disponibilidade de recursos e faixas de forrageamento alterados, exibem deformações mais marcantes nas asas, enfatizando ainda mais a intrincada interação entre morfologia e ambiente. Ou seja, a assimetria da asa em *T. angustula* pode ser influenciada de forma negativa por diferentes fatores ambientais nas áreas urbanas. Os recursos alimentares disponíveis e sua qualidade no ambiente urbano podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento simétrico das asas das abelhas e esse fator deve ser avaliado no futuro para a espécie. Em virtude das variações de assimetria e morfologia, possivelmente também associada às variações de temperatura, é interessante avaliar o real efeito de controle térmico de colônias urbanas. Desta forma, é plausível que a alteração na morfologia e dimensões das asas possa impactar o desempenho e a resistência física da espécie em cidades.

6. REFERÊNCIAS

- Aidar, D. (1999). Variabilidade genética em populações de *Melipona quadrifasciata anthiodes* Lepeletier e *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Tese de Doutorado, FFCLRP/USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 67p.
- Banaszak-Cibicka, W., Fliszkiewicz, M., Langowska, A., & Żmihorski, M. (2018). Body size and wing asymmetry in bees along an urbanization gradient. *Apidologie*, 49, 297-306.
- Benítez, H. A., Lemic, D., Villalobos-Leiva, A., Bažok, R., Órdenes-Claveria, R., Pajač Živković, I., & Mikac, K. M. (2020). Breaking symmetry: Fluctuating asymmetry and geometric morphometrics as tools for evaluating developmental instability under diverse agroecosystems. *Symmetry*, 12(11), 1789.
- Birdshire, K. R., Carper, A. L., & Briles, C. E. (2020). Bee community response to local and landscape factors along an urban-rural gradient. *Urban Ecosystems*, 23, 689-702.
- Braga, J. A., Sales, E.O., Soares-Neto, J., Conde, M. M., Barth, O. M., Maria, C. L. (2012) Floral sources to *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae) and their pollen morphology in a Southeastern Brazilian Atlantic Forest. *Revista de Biologia Tropical*. 1, 491-501.
- Brakefield, P. (1997). Plasticidade fenotípica e assimetria flutuante como respostas ao estresse ambiental na borboleta *Bicyclus anynana*. 65-78.

- Chávez-Galarza, J., Henriques, D., Johnston, J., Azevedo, J., Patton, J., Muñoz, I., Rúa, P., & Pinto, M. (2013). Signatures of selection in the Iberian honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) revealed by a genome scan analysis of single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, *22*.
- Chole, H., Woodard, S. H., & Bloch, G. (2019). Body size variation in bees: regulation, mechanisms, and relationship to social organization. *Current Opinion in Insect Science*, *35*, 77-87.
- Coomes, C. M., Danner, R. M., & Derryberry, E. P. (2019). Elevated temperatures reduce discrimination between conspecific and hetero-specific sexual signals. *Animal Behavior*, *147*, 9–15
- Couvillon, M. J., Schürch, R., & Ratnieks, F. L. (2014). Waggle dance distances as integrative indicators of seasonal foraging challenges. *PloS one*, *9*(4), e93495.
- Daly, H. V. (1985). Insect morphometrics. *Annual review of entomology*, *30*(1), 415-438.
- De Block, M., Campero, M., Stoks, R. (2008) Developmental costs of rapid growth in a damselfly. *Ecol Entomol* *33*, 313–318.
- Francoy, T. M., de Faria-Franco, F., & Roubik, D. W. (2012). Integrated landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie*, *43*, 609-617.
- Freitas, G. S., Santana, W. C., Akatsu, I. P. & Soares, A. E. E. (2007). Abelhas para a melhor idade: curso de meliponíneos, alfabetização técnica para a conservação. *Bioscience Journal*, *23*.
- Hammer, O. & Harper, D. A. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, *4*(1), 1.
- Hannickel, A., Silva, M. H. P., Barros, H. L., Albuquerque, P. M. (image j como ferramenta para medida da área de partículas de magnetita em três escalas nanométricas). 2012.
- Helm, B. R., Baldwin, M. A., Rinehart, J. P., Yocum, G. D., Greenlee, K. J., & Bowsher, J. H. (2021). Body and wing allometries reveal flight-fecundity tradeoff in response to larval provisioning in *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Insect Science*, *21*(3), 11.
- Hoffmann, A. A., Woods, R. E., Collins, E., Wallin, K., White, A., & McKenzie, J. A. (2005). Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. *Australian Journal of Entomology*, *44*(3), 233-243.
- Hostetler, N. E., & McIntyre, M. E. (2001). Effects of urban land use on pollinator (Hymenoptera: Apoidea) communities in a desert metropolis. *Basic and Applied Ecology*, *2*(3), 209-218.
- Klingenberg, C. P., McIntyre, G. S., & Zaklan, S. D. (1998). Left–right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *265*(1402), 1255-1259.

- Lunardi, J. S. (2022). Efeito de herbicidas no comportamento e morfologia de abelhas *Apis mellifera*. Universidade Estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências 55p.
- Masaquiza, D., Ferrán, M. O., Guamán, S., Naranjo, E., Vaca, M., Curbelo, L. M., & Arenal, A. (2023). Geometric Morphometric Analysis of Wing Shape to Identify Populations of *Apis mellifera* in Camagüey, Cuba. *Insects*, 14(3), 306.
- Maxence, G., Amiri, A., Cariou, B. & Baird, E. (2022). Short-term exposure to heatwave-like temperatures affects learning and memory in bumblebees. *Global Change Biology*, 28, 4251-4259.
- Migdał, P., Roman, A., Popiela-Pleban, E., Kowalska-Góralaska, M., & Opaliński, S. (2018). The impact of selected pesticides on honey bees. *Polish Journal of Environmental Studies*, 27(2) 787–792.
- Mohammed, G. (2018). Review on Effect of Pesticide on Environment, Honey Bees and Hence on Humans. *Journal of environment and earth science*, 8, 1-11.
- Mota, G. S., Luz, G. R., Mota, N. M., Coutinho, E. S., Veloso, M. D. D. M., Fernandes, G. W., & Nunes, Y. R. F. (2018). Changes in species composition, vegetation structure, and life forms along an altitudinal gradient of rupestrian grasslands in south-eastern Brazil. *Flora*, 238, 32-42.
- Nogueira-Neto, P. (1970). A criação de abelhas indígenas sem ferrão:(Meliponinae). 447p.
- Nunes, L. A., de Araújo, E. D. & Marchini, L. C. (2015). Asimetría fluctuante en *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) como bioindicador de ambientes antropogénicos. *Revista de Biología Tropical*, 63(3), 673-682.
- Peil, A. C. & Aranda, R. (2021). Potential niche modeling distribution and wing geometric morphometrics of *Apis mellifera* in the Brazilian Pantanal. *Sociobiology*, 68(2), e5629-e5629.
- Poquet, Y., Kairo, G., Tchamitchian, S., Brunet, J L., Belzunces, L P. (2015) Wings as a new route of exposure to pesticides in the honey bee. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 34, n. 9, p. 1983-1988.
- Quezada-Euán, J., López-Velasco, A., Pérez-Balam, J., Moo-Valle, H., Velazquez-Madrado, A., & Paxton, R. (2011). Body size differs in workers produced across time and is associated with variation in the quantity and composition of larval food in *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 58, 31-38.
- Reim, E., Eichhorn, D., Roy, J. D., Steinhoff, P. O., & Fischer, K. (2019). Nutritional stress reduces flight performance and exploratory behavior in a butterfly. *Insect Science*, 26(5), 897-910.
- Rodrigues F., Ribeiro M. F. (2014) Influence of experience on homing ability of foragers of *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology* 61(4), 523-528.

- Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, 8(4), 129-132.
- Rundlöf, M., Andersson, G., Bommarco, R. (2015). Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521, 77–80.
- Sánchez-Echeverría, K., Castellanos, I., Mendoza-Cuenca, L., Zuria, I., & Sánchez-Rojas, G. (2019). Reduced thermal variability in cities and its impact on honey bee thermal tolerance. *PeerJ*, 7, e7060.
- Stabentheiner, A., Kovac, H., Mandl, M., & Käfer, H. (2021). Coping with the cold and fighting the heat: thermal homeostasis of a superorganism, the honeybee colony. *Journal of Comparative Physiology A*, 207(3), 337-351.
- Theodorou, P., Kühn, O., Baltz, L. M., Wild, C., Rasti, S. L., Bucksch, C. R., ... & Kurze, C. (2022). Bumble bee colony health and performance vary widely across the urban ecosystem. *Journal of Animal Ecology*, 91(10), 2135-2148.
- Tüzün, A. (2009). Significance of wing morphometry in distinguishing some of the hymenoptera species. *African Journal of Biotechnology*, 8, 3353-3363
- Vaca-Sánchez, M. S., Cuevas-Reyes, P., Munck, I., Oki, Y., Moia, N., Freitas, T. & Fernandes, G. W. (2023). Patterns in Wing Morphology and Fluctuating Asymmetry in *Eulaema nigrita* along an Altitudinal Gradient in the Brazilian Rupestrian Grassland. *Neotropical Entomology*, 1-11.
- Vaudo, A., Tooker, J., Grozinger, C. & Patch, H. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current opinion in insect science*, 10, 133-141.
- Warren, M., Kram, K. & Theiss, K. (2020). Characterizing the nectar microbiome of the non-native tropical milkweed, *Asclepias curassavica*, in an urban environment. *PLoS ONE*, 15.
- Weller B., Ganzhorn J. U. (2004). Carabid beetle community composition, body size, and fluctuating asymmetry along an urban-rural gradient. *Basic Appl. Ecol.* 5:193-201.
- Witter, S. & Blochtein, B. (2009). *Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul*. Centro Ecológico Ipê-Serra, Litoral Norte.
- Xiong, Y., Liu, J. & Kim, J. (2019). Understanding differences in thermal comfort between urban and rural residents in hot summer and cold winter climate. *Building and environment*, 165, 106393.
- Zhang, S., Yin, Y., Lu, H. & Guo, A. (2008). Increased dopaminergic signaling impairs aversive olfactory memory retention in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 82-86.