



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL



FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA

CARACTERIZACIÓN DE MICRO Y NANOESTRUCTURAS QUITÍNICAS DE ALAS DE MARIPOSAS DEL BOSQUE TROPICAL DE ECUADOR Y SU POTENCIAL APLICACIÓN

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGISTER EN MATERIALES**

QUEENNY KELLY LÓPEZ ALVARADO
queenny.lopez@epn.edu.ec

DIRECTOR: CÉSAR COSTA VERA, PHD
cesar.costa@epn.edu.ec

CO-DIRECTOR: RAFAEL CÁRDENAS MUÑOZ, PHD
recardenas@puce.edu.ec

JULIO, 2022

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por **QUEENNY KELLY LÓPEZ ALVARADO**, bajo nuestra supervisión.



Firmado electrónicamente por:
**CESAR AUGUSTO
COSTA VERA**

Digitally signed by
Rafael Cárdenas
DN: cn=Rafael
Cárdenas, o, ou,
email=aequatoria_rc
@hotmail.com, c=EC
Date: 2022.09.05
15:23:58 -05'00'

César Costa Vera, PhD
DIRECTOR DE PROYECTO


Rafael Cárdenas Muñoz, PhD
CO-DIRECTOR DE PROYECTO

DECLARACIÓN

Yo, **Queenny Kelly López Alvarado**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondiente a este trabajo, a la Escuela Politécnica Nacional, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Queenny
Kelly López
Alvarado



Firmado digitalmente
por Queenny Kelly
López Alvarado
Fecha: 2022.09.05
14:47:14 -05'00'

Queenny Kelly López Alvarado

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Formulación del problema	2
Justificación.....	3
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis	4
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Generalidades	5
1.2. Nanoestructuras y coloración	7
1.3. Tipos de nanoestructuras	8
1.4. Caracterización de nanoestructuras	12
2. METODOLOGÍA.....	14
2.1. Especímenes.....	14
2.2. Caracterización de las alas.....	15
Microscopía óptica.....	15
Microscopía electrónica de barrido	15
Espectroscopía con escáner multiespectral	17
Termogravimetría	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Caracterización de nanoestructuras	19
Microscopía óptica.....	19
Microscopía electrónica de barrido	19
Espectroscopía con escáner multiespectral	21
Termogravimetría	29
3.2. Discusión.....	32
4. CONCLUSIONES	35
Referencias Bibliográficas	37
ANEXOS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de coloración presentes en las alas de mariposas	6
Figura 2. Nanoestructuras típicas Tipo I.....	8
Figura 3. Nanoestructuras típicas Tipo II.....	9
Figura 4. Nanoestructuras típicas Tipo III.....	10
Figura 5. Nanoestructuras tipo IV.....	11
Figura 6. Distribución de las especies colectadas de acuerdo a la estratificación de bosque.....	15
Figura 7. Zonas de las alas analizadas espectral y microscópicamente.....	16
Figura 8. Ubicación en portamuestras para observación en SEM.....	16
Figura 9. Esquema general y fotografía del escáner multiespectral	17
Figura 10. Equipo TGA empleado para los análisis	18
Figura 11. Micrografías ópticas.....	19
Figura 12. Micrografías obtenidas por cada especie analizada.....	20
Figura 13. Formación espectral resultante del ala anterior de <i>Colobura annulata</i>	21
Figura 14. Reconstrucción de imagen del ala anterior de <i>Colobura annulata</i>	22
Figura 15. Espectros de la zona apical del ala anterior de <i>Colobura annulata</i> . a) Visible, b) Infrarrojo cercano, c) UV	22
Figura 16. Distribución de índices de reflectancia NIR, Vis y UV	24
Figura 17. Gráfico de cajas y bigotes para el rango NIR.....	25
Figura 18. Gráfico de Cajas y Bigotes para el rango Vis	26
Figura 19. Gráfico de cajas y bigotes para el rango UV	27
Figura 20. Índices de reflectancia NIR, Vis y UV vs. Índices de estratificación.....	28
Figura 21. Dendograma de las especies analizadas en función de los índices Vis, NIR y UV.....	29
Figura 22. Termografía de <i>Hamadryas amphinome</i>	29
Figura 23. Pérdida de masa de las muestras analizadas	30
Figura 24. Gráficas de cajas y bigotes para cada rango de temperatura según estrato de bosque.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales técnicas de caracterización de escamas de alas de mariposas ..	12
Tabla 2. Especies de mariposas seleccionadas para el estudio.....	14
Tabla 3. Índices de relación NIR, Vis y UV.....	23
Tabla 4. Test de Shapiro-Wilk para cada conjunto de datos	25
Tabla 5. Post hoc de Dunn para el rango NIR.....	25
Tabla 6. Post hoc de Tukey para el rango visible.....	26
Tabla 7. Post hoc de Dunn para rango UV.....	27
Tabla 8. Valor-p de la correlación de Pearson entre índice de estratificación e índices por rango de luz.....	27
Tabla 9. Pérdida general de masa en porcentaje por rango de temperatura.....	29
Tabla 10. Test de Shapiro-Wilk para datos TGA.....	31

RESUMEN

Las nanoestructuras que conforman las alas de mariposas son complejos arreglos físicos cuyas propiedades ópticas, térmicas y mecánicas resultan interesantes en el campo de la ciencia e ingeniería de materiales en relación con el desarrollo de nuevos materiales. En este trabajo, se realizó la caracterización de nanoestructuras alares de 12 especies de mariposas del bosque tropical del chocó ecuatoriano las cuales presentan un vuelo predominante en un estrato vertical definido del bosque (dosel, estrato medio y sotobosque) con características específicas de luz y temperatura. Para la caracterización se emplearon ensayos de microscopía, espectroscopía y termogravimetría lo que permitió identificar particularidades de las nanoestructuras de las especies de acuerdo al estrato de bosque donde habitan. Los resultados indican que la composición química de las alas es similar para todas las especies, sin embargo, existen diferencias significativas en las nanoestructuras predominantes y su respuesta al espectro electromagnético en los rangos UV, visible e infrarrojo cercano (NIR). Las especies analizadas, pertenecientes a la familia *Nymphalidae*, muestran mayor absorbancia de luz en el rango UV seguido del NIR y del visible, además, las mariposas con vuelo predominante en el estrato de sotobosque muestran mayor absorbancia en el visible que aquellas de dosel y estrato medio, las que además muestran de manera general, un arreglo nanoestructural de las alas con menor cantidad de espacios vacíos y mayor prominencia de crestas y laminillas. Esta caracterización es un primer paso para analizar oportunidades de desarrollo de tecnologías biomiméticas cuyo desempeño podría tener resultados más eficientes e innovadores en relación a los rangos de espectro electromagnético analizados.

Palabras clave: Alas de mariposas, espectroscopía, microscopía, nanoestructuras biológicas, termogravimetría.

ABSTRACT

The nanostructures that make up butterfly wings are complex physical arrangements whose optical, thermal and mechanical properties are of interest in the field of materials science and engineering for the development of new materials. In this work, the characterization of wing nanostructures of 12 species of butterflies from the tropical forest of the Ecuadorian Chocó was carried out, which have a predominant flight in a defined vertical stratum of the forest (canopy, middle stratum and understory) with specific characteristics of light and temperature. For the characterization, microscopy, spectroscopy and thermogravimetry tests were used to identify particularities of the nanostructures of the species according to the forest stratum where they live. The results indicate that the chemical composition of the wings is similar for all species, however, there are significant differences in the predominant nanostructures and their response to the electromagnetic spectrum in the UV, visible and NIR ranges. The analyzed species, belonging to the *Nymphalidae* family, show higher light absorbance in the UV range followed by the NIR and the visible range, in addition, butterflies with predominant flight in the understory stratum show higher absorbance in the visible than those in the canopy and middle stratum, which also show a general nanostructural arrangement of the wings with fewer empty spaces and greater prominence of ridges and lamellae. This characterization is a first step to analyze opportunities for the development of biomimetic technologies whose performance could have more efficient and innovative results in relation to the electromagnetic spectrum ranges analyzed.

Keywords: Butterfly wings, spectroscopy, microscopy, biological nanostructures, thermogravimetry.

“CARACTERIZACIÓN DE MICRO Y NANOESTRUCTURAS QUITÍNICAS DE ALAS DE MARIPOSAS DEL BOSQUE TROPICAL DE ECUADOR”

INTRODUCCIÓN

La ciencia de materiales es un campo científico que centra su investigación en la relación que existe entre la estructura y las propiedades de los materiales [1]. Este fascinante ejercicio de exploración es en esencia multidisciplinario ya que vincula varias ramas para lograr descifrar tanto las propiedades macroscópicas de los materiales como su aplicación, dando lugar así a la ingeniería de materiales. A pesar de que estas ramas de conocimiento se ubican en la industria 4.0 y que ha habido avances significativos, existe un permanente desafío en el desarrollo de materiales cada vez más especializados, por tanto, la investigación de potenciales fuentes de inspiración para nuevos materiales es fundamental en la construcción de una sociedad basada en la innovación y la sostenibilidad [2].

Como sociedad, nuestra primera y más confiable fuente de inspiración para desarrollo tecnológico es por excelencia la naturaleza. Con más de 3.8 miles de millones de años, la vida ha logrado desarrollar estrategias funcionales, sostenibles, especializadas y optimizadas para cumplir sus objetivos. Un ejemplo de ello, son las alas de mariposas, una de las estructuras tridimensionales más complejas de la naturaleza que presentan fascinantes propiedades mecánicas, ópticas y térmicas [3], [4].

Desde la ciencia de materiales y el campo de las nanociencias se ha demostrado que las propiedades de las alas de las mariposas se deben en parte a su coloración, la cual viene dada por dos procesos importantes: la coloración química y la coloración física [5], siendo esta última de particular interés por las propiedades ya dicha, las cuales están asociadas a la estructura y configuración del material del que están compuestas las alas. La diversidad relacionada a la coloración nanoestructural podría ser una respuesta adaptativa o evolutiva a presiones de selección, al igual que la alometría y morfología de las alas e incluso potencializarse mutuamente [6].

Este trabajo se centra en la evaluación de 12 especies de mariposas carroñeras (familia *Nymphalidae*) del bosque tropical del chocó ecuatoriano y tiene como objetivo revisar las principales características de las nanoestructuras y coloración física de sus alas asociadas a su interacción con el calor (intercambio de energía térmica), temperatura (energía cinética interna) y el espectro electromagnético, con la finalidad de identificar propiedades de éstas y su relación con aspectos ecológicos. Hasta lo que se conoce,

este es el primer estudio que reporta un análisis dentro del estrato vertical de bosque de la variación de micro y nano estructuras de alas de mariposas y sus respectivas propiedades térmicas y ópticas como primer paso para potenciales aplicaciones tecnológicas en el área de materiales especializados.

Este documento se estructura de la siguiente manera: en el capítulo introductorio se aborda de manera general el contenido del trabajo de investigación, se discuten las motivaciones y justificaciones que permitieron definir el tema de este trabajo y los vacíos del conocimiento en este campo. En el capítulo del marco teórico se compila información relevante sobre los temas relacionados a la coloración estructural y nanoestructuras en alas de mariposas mediante una revisión bibliográfica que incluye además las metodologías empleadas para la caracterización de estas. La sección de metodología detalla los materiales y métodos empleados para la caracterización de las nanoestructuras mediante los ensayos de microscopía, espectroscopía y termogravimetría. Los resultados son presentados y discutidos en el capítulo siguiente para finalizar con una sección de conclusiones que incluyen algunas recomendaciones para el futuro abordaje de estudios relacionados a esta investigación.

Formulación del problema

El rápido desarrollo de nuevos materiales y nanomateriales ha marcado un hito en los campos de investigación de ciencia e ingeniería de materiales [2]. Tanto es así que se enlistan dentro de la revolución 4.0 junto a otros campos emergentes de la ciencia y tecnología [7]. Además, el desarrollo de nanoestructuras para diversas aplicaciones mantiene una sinergia con otras tecnologías, permitiendo el desarrollo de productos y procesos significativamente innovadores y con alto valor agregado [2].

En este sentido, existen innumerables nanoestructuras biológicas con características físicas de gran complejidad y potenciales aplicaciones. El desarrollo de estructuras a cualquier escala inspiradas en la naturaleza es una de las aplicaciones biomiméticas más estudiadas en la actualidad. Esto ha dado lineamientos optimizados para el diseño de nuevos materiales nanoestructurados que permiten abordar desafíos ópticos, relacionados a la captura y conversión de energía, detección de variables externas, comunicación, procesamiento de datos, entre otros [8], [9].

La caracterización de estas nanoestructuras es el punto de partida para el desarrollo de nanomateriales cuya aplicabilidad es emergente pero prometedora [10], por lo que es tanto un reto como una oportunidad identificarlas y definir las en su naturaleza física, pero también es de interés científico el entender las condiciones naturales que han llevado a estos seres vivos a adoptar tal diseño ya que podrían ayudar a dilucidar los

mecanismos para la optimización y la eficiencia en el aprovechamiento de recursos [7]. Partiendo de que los procesos evolutivos generan constante adaptación y desarrollo, no es precipitado aseverar que las formas, estructuras y procesos que se han perfeccionado o mantenido son las más optimizados y funcionales posibles, representando entonces una fuente significativa de información y guía para la innovación y desarrollo técnico [8]

Por tanto, desarrollar metodologías de caracterización de nanoestructuras biológicas es un campo de investigación con amplias perspectivas, similar a la vastedad de la diversidad de las mismas. Dentro de estas, las nanoestructuras presentes en las especies de animales de la Clase *Insecta* resultan atractivas e interesante de analizar constituyen aproximadamente el 66% de la diversidad animal global, lo que demuestra de cierto modo que sus estrategias evolutivas y adaptativas han perdurado [11].

La razón de por qué los insectos han sido predominantes en la Tierra tiene que ver con su capacidad de adaptación, plasticidad fenotípica, estrategias reproductivas, uso eficiente del nicho, y aspectos relacionados a resistencia y resiliencia a factores de estrés [12]. Caracterizar nanoestructuras biológicas de insectos, animales ectotérmicos, significa descubrir características físicas que conllevan al máximo aprovechamiento de recursos, como la luz y el calor, con la mayor optimización de materiales y al menor costo energético. Los insectos representan la mejor innovación en materiales nanoestructurados multifuncionales [9] por lo cual, es pertinente y relevante su estudio más allá de los aspectos biológicos, sino también en el área de las nanociencias y materiales como parte de un proceso de desarrollo e innovación.

Justificación

Como se ha mencionado, los insectos representan un nicho importante para estudios biomiméticos relacionados a la nanotecnología y ciencias de materiales. A pesar de que Ecuador es uno de los países con mayor diversidad de especies dentro del Orden Lepidoptera [13], las investigaciones relacionadas a la caracterización física funcional desde las nanociencias y el campo de los materiales ha sido limitada.

Las alas de mariposas están formadas por escamas individuales [14] en arreglos tridimensionales con características físicas excepcionales [3] como aquellas relacionadas a fenómenos ópticos [5] y térmicos [15], las cuales forman parte de las estrategias de funcionalidad biológica de estas especies.

Por otro lado, una característica relevante de los bosques tropicales de tierras bajas es la drástica variabilidad de temperatura (4 a 10°C) y disponibilidad de luz (1 al 100%)

entre el sotobosque y el dosel [16]. Esta variación es mucho más pronunciada que los gradientes climáticos en latitud y altitud los cuales generalmente presentan una variación de 1°C cada 100 metros de altitud [17] o cada ~150 km hacia el Ecuador desde el norte [18]. A pesar de que se ha determinado cierta estratificación morfológica macroscópica y alométrica de las alas [6] no se ha hecho lo propio en relación a nanoestructuras.

Específicamente, el estudio estratificado de variación de micro y nano estructuras y sus respectivas propiedades en alas de mariposas dentro del gradiente lumínico y de temperatura entre sotobosque y dosel adolece de un gran vacío de estudio. Asimismo, su estudio presenta grandes oportunidades de aplicación tecnológica con importantes réditos. Ejemplo de ello es la creación de nuevos y mejores sistemas de captación de energía tanto lumínica como calórica, pero demanda el desarrollo, prueba e implementación de métodos adecuados para la caracterización a escalas micro y nanométricas. En lo que sigue se resumen los objetivos planteados en la realización de este trabajo.

Objetivo general

Caracterizar térmica y ópticamente las nanoestructuras quitínicas de alas de mariposas de un bosque de tierras bajas del Ecuador en relación a la estratificación interna del bosque.

Objetivos específicos

- Seleccionar especies de mariposas que habitan en el sotobosque, estratificación media y dosel del bosque de tierras bajas de la biorregión del Chocó del Ecuador para analizar sus características físicas.
- Caracterizar microscópica, óptica y térmicamente las alas anteriores y posteriores de las especies seleccionadas.
- Identificar relaciones entre las nanoestructuras de las alas, sus propiedades térmicas y ópticas y la estratificación ecológica de las mariposas dentro del bosque.

Hipótesis

La respuesta de reflectancia difusa en los rangos NIR, visible y UV de las alas de mariposas y nanoestructuras presentes en las especies seleccionadas varía en función del nivel de estratificación que estas presentan dentro de un gradiente vertical del bosque.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades

Uno de los retos más importantes para la sobrevivencia y reproducción en las poblaciones de animales ectotérmicos como los insectos y dentro de ellos las mariposas, es su capacidad de termorregulación [19]. La mayoría de las mariposas (si no todas) necesitan alcanzar una temperatura corporal de 20 a 50°C para iniciar su vuelo sin importar la temperatura de su hábitat [20]–[22]. Parte de las estrategias de termorregulación tienen que ver con el comportamiento, la selección de microhábitats específicos o la variación de la posición del cuerpo lo cual permite regular en gran medida la temperatura corporal [15]. Sin embargo, una característica importante para mantener y controlar la temperatura corporal, principalmente torácica, es la capacidad de absorción de energía luminosa la cual está estrechamente ligada a la coloración de las alas [16].

Las alas de mariposas, conformadas por escamas individuales de quitina (proteína sin color) el polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa [11], son unas de las estructuras tridimensionales más complejas que existen [3]. Las alas obtienen su coloración tanto por la presencia de pigmentos claros y oscuros, como por el arreglo de nanoestructuras de quitina [5]. Ambos tipos de coloración tienen un importante rol en las estrategias de desarrollo, interacción ecológica y evolución [11], [12], incluyendo la capacidad de termorregulación, mecanismo clave para garantizar diversos procesos biológicos y ecológicos [13], [14] como la reproducción y la supervivencia en general [19].

Por una parte, está la coloración química la cual es atribuida principalmente a la generación de melanina y otros pigmentos como respuesta ectópica a condiciones genéticas y epigenéticas, incluso a partir de la formación de pupas y orugas [17], [18]. Las especies e individuos más oscuros pueden calentarse más rápidamente y alcanzar temperaturas de equilibrio en condiciones más frías [19], por lo tanto, generalmente se entiende que en un clima más cálido hay especies e individuos con reflectancia más alta, dejando solo al melanismo como factor condicionante [20], aunque existen otros factores que pueden alterar el color o incluso crear una sinergia con la temperatura ambiental [30]. Además, los patrones de color de las alas no son una disposición aleatoria, sino estructuras anatómicas bidimensionales (como los dedos en los mamíferos), lo que significa que hay patrones básicos generales “ideales” que contienen los patrones reales observados en individuos con un mecanismo evolutivo y mecanicista [21].

Por otra parte, la coloración física o estructural, se debe a complejos arreglos micro y nanoestructurados de quitina, arreglos que forman las escamas constitutivas de las alas [22], [23]. La coloración física permite absorber energía en distintas longitudes de onda [24], incluso más que la coloración química [15], además de generar algunas otras propiedades como la iridiscencia atractiva, la hidrofobicidad, la capacidad de disipación rápida del calor [3], propiedades depurativas, antiadhesivas, aerodinámicas [25], ópticas (como antirreflectantes) [26]–[29], y características magnéticas [30]. Estas estructuras inclusive ayudan al sistema de irrigación en el cual la hemolinfa de las venas alares logra alcanzar los valores mínimos para permitir levantar vuelo [25]. Se sabe que los procesos de selección y adaptación en las mariposas tienen repercusiones en sus nanoestructuras como en el grosor de la cutícula, la coloración de las alas ventral y dorsal. También inciden creando nanoestructuras especializadas que permiten proteger los tejidos vivos que se encuentran dentro de las alas de las temperaturas inadecuadas [31]. La Figura 1. presenta una descripción esquemática de los tipos de coloración presentes en las alas de mariposas.

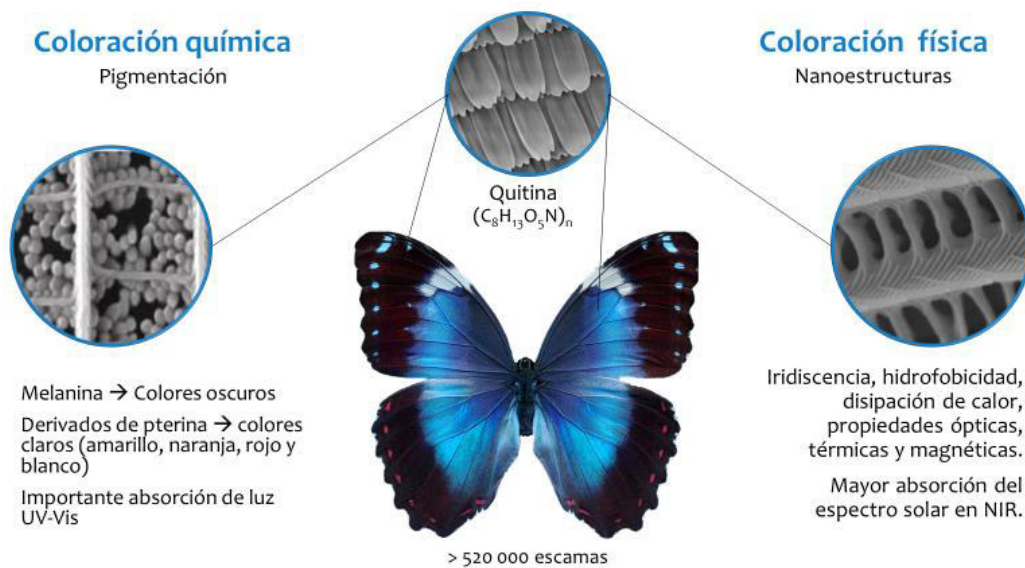


Figura 1. Tipos de coloración presentes en las alas de mariposas

Fuente: Elaboración propia

La singularidad de las estructuras que presentan las alas de mariposas se ha estudiado para múltiples aplicaciones. Por ejemplo, la diversidad de estructuras ha servido de inspiración en la elaboración de cristales fotónicos fabricados en polímeros a partir de plantillas de alas de mariposa, cuyos resultados han sido la corrección de ciertas longitudes de onda y variación en la humectabilidad en métodos de síntesis de polímeros como la biomodelación (biotemplating, en inglés) [41]. También en aplicaciones de productos en la industria cosmética para cuidados dermatológicos [42]

y para el diseño y fabricación de materiales biónicos y sustratos autolimpiables [43]. Sin embargo, aún no se han estudiado ni desarrollado aplicaciones a partir de estructuras inspiradas en alas de mariposa en términos de intercambio de calor. Se ha demostrado que las nanoestructuras presentes en las alas tienen una influencia importante en los aspectos de la termorregulación, tanto en la absorción de radiación dentro del rango de la luz solar como en el NIR, así como en la capacidad de emitir y disipar el exceso de calor [44].

1.2. Nanoestructuras y coloración

Estructuralmente, toda el ala de una mariposa está formada por una doble lámina membranosa que ha tenido un desarrollo embrionario bidimensional y que también está cubierta por escamas individuales [25]. En la naturaleza existe una alta heterogeneidad en la densidad de escamas en las alas de mariposas, presentando hasta un 19% más de densidad en la parte superior que la inferior, aunque esta es independiente del tamaño del ala [25].

La mayoría de las mariposas tienen alas con dos capas distintas de escamas las cuales tienen una dimensión del orden de 75 a 200 μm [45], desarrolladas a partir de una sola célula epidérmica. Las láminas se pueden describir como escamas terrestres o de fondo y escamas de cobertura. Las escamas individuales suelen formar un ángulo de 10 a 20° con respecto a la superficie del ala [46]. Ambos tipos de escamas tienen una superficie superior con formas complejas, mientras que la superficie inferior, que están cercada a la membrana del ala, presenta características menos notables o significativas [47].

Aunque existen diferentes nanoestructuras, con o sin iridiscencia, en general, las alas tienen crestas longitudinales que se ubican paralelas al eje de las escamas las cuales están separadas entre sí con un espacio de 500 a 5000 nm y están interconectadas por arcos conocidos como *nervaduras o costillas transversales*, que forman “ventanas” en la estructura de las escamas [45] las cuales constituyen una capa o se colocan sobre una membrana. En las crestas, se pueden encontrar nanoestructuras más finas en forma de laminillas. En la mayoría de las escamas, los espacios entre la capa de la cresta y la lámina inferior de la escama debajo están llenos de aire [48]. La melanina, principal pigmento de las alas oscuras, se puede distribuir en toda la superficie de las escamas y sus estructuras y, si existen otros pigmentos estos se encuentran generalmente en gránulos o pequeñas esferas en las ventanas formadas entre las crestas y las costillas transversales como se ilustra en la Fig. 1 [49]. En la complejidad de las alas, se podría entender cada escama como un píxel en una imagen digitalizada aportando un punto de color a la imagen [46]. Las escamas pueden aparecer en

cualquier parte del cuerpo de los insectos, pero en las alas son más evidentes en cuanto al color, y es característico de la especie, el sexo, la edad, y la parte del ala (dorsal, ventral, anterior o posterior) [50].

1.3. Tipos de nanoestructuras

Varios autores han propuesto diferentes sistemas para clasificar las estructuras presentes en las alas de mariposas. A continuación, se muestra una clasificación de 4 categorías que recogen las principales características de las alas en general, las cuales pueden estar presentes en cualquier zona de las alas.

Tipo I: estructuras no especializadas

A diferencia de las otras estructuras que se revisan a continuación, estas escamas no presentan ninguna estructura especializada. Las alas están conformadas por dos filas alternas de escamas con un largo conjunto de escamas de cobertura que se superponen y ocultan un conjunto más corto de escamas “terrestres” o de fondo. Estas nanoestructuras se caracterizan por tener crestas cuasi paralelas a lo largo de la escama cubiertas por finas laminillas que forman un conjunto de planos difractantes leves mientras que las crestas configuran planos difractantes intensos y tienen una configuración más compleja que les permite tener una actividad óptica más prominente [47]. Adicionalmente, existe una formación de “ventanas” por costillas o nervaduras transversales que se extienden de cresta a cresta, acompañadas de nanocostillas que a su vez forman las hileras de estas. De estas ventanas entre crestas, se extienden una serie de pilares o “trabéculas” que unen la superficie inferior y superior. La Figura 2. muestra los componentes de nanoestructuras Tipo I típicas.

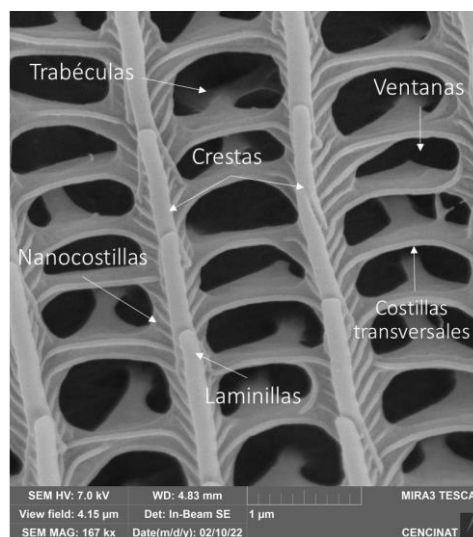


Figura 2. Nanoestructuras típicas Tipo I

Algunas estructuras Tipo I pueden presentar alguna otra característica excepcional periódica, lo cual da como resultado una intensificación de la iridiscencia en longitudes de onda cortas [51]. En este tipo de estructura, la subclasificación podría incluir el hecho de que algunas de estas escamas recogen perlas de pigmentos en su superficie. Estos pigmentos incluyen pterinas como leucopterina, xantopterina y eritropterina [52], [53], y son responsables de los colores más claros como el blanco, amarillo y naranja, además se tienen pigmentos de melanina, responsable de la coloración más oscura, significativamente presente en las escamas del fondo [49].

Tipo II: cresta de laminillas

Este tipo de escamas se denominan reflectores de película fina y están formados por una serie de laminillas superpuestas formando crestas multicapa que dan el color a varias especies de mariposas, principalmente las más brillantes [45]. Las laminillas apiladas pueden ser paralelas o casi paralelas a la base de la escama, aunque es común que haya de 3 a 9 laminillas, puede haber hasta doce capas de laminilla por cresta, aquellas con menor número de laminillas presentan menor brillo [31], [42].

Con esta disposición de escamas, las longitudes de onda en el rango UV presentan una mayor reflectancia por la interferencia constructiva que forman las interfaces entre los dos medios y que depende del espacio de las capas y del ángulo de incidencia de la luz [54]. Las especies icónicas con este tipo de estructura incluyen al género *Morpho* cuya iridiscencia azul brillante es generada por la interferencia multicapa que genera reflectividad absoluta en longitudes de onda del azul de hasta el 80% [55]. La Figura 3. muestra nanoestructuras de Tipo II típicas.

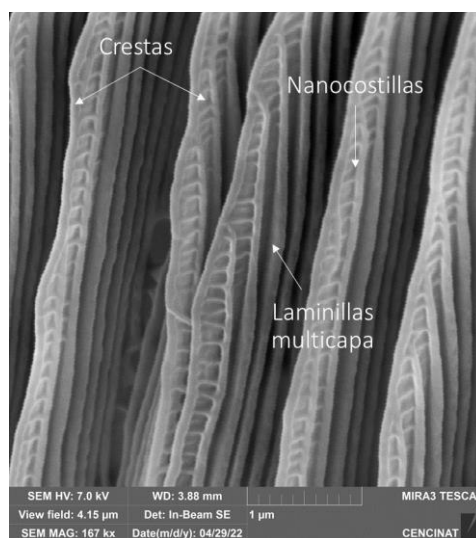


Figura 3. Nanoestructuras típicas Tipo II

Esta categoría incluye algunas subcategorías de acuerdo al ángulo de inclinación de las crestas con respecto a las escamas, como se describe a continuación:

- Tipo IIa: presenta una inclinación lateral de las crestas y de las superficies de las laminillas generando un amplio ángulo de dispersión de la reflexión en un plano [56].
- Tipo IIb: las crestas formadas por las laminillas suelen tener una inclinación moderada respecto de la base de la escama. Generalmente, las capas pueden tener de 5 a 6 laminillas que, sumado al ángulo de inclinación más pronunciado, forman una gama más amplia de colores reflejados estructuralmente que aquellos de las escamas del tipo anterior [45].
- Tipo IIc: el ángulo de inclinación de la multicapa es más pronunciado, casi ortogonal respecto de la base de la escama. Estas capas pueden formarse como una multicapa más pronunciada de las nanocostillas y no de laminillas, dando como resultado un color estructural menos intenso [55].

Tipo III: estructuras porosas

Las estructuras porosas se forman cuando las costillas transversales especializadas se extienden de cresta a cresta, y en lugar de ventanas se tiene un patrón poroso no regular en donde puede o no haber costillas transversales. La Figura 4. muestra una estructura porosa típica tipo III.

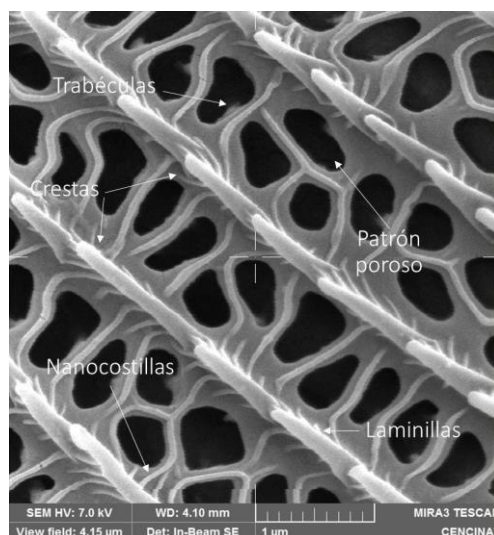


Figura 4. Nanoestructuras típicas Tipo III

Este patrón poroso podría contribuir a la baja reflectancia de algunas especies mariposas y polillas. Para el caso de estructuras tipo III, estas forman un patrón reticular

llamado estructura cuasi panal, que conforman generalmente escamas oscuras [57]. Mientras más embrolladas y densamente se encuentra formado el patrón poroso, la luz suele ser más dispersada [58].

Tipo IV: laminillas corporales

Las laminillas corporales están formadas por costillas transversales que van de cresta a cresta cubriendo la mayor parte o toda la superficie de la escama. Aquí, las ventanas suelen desaparecer o quedar solo algunas de ellas, más en las hileras con mayor separación [47].

En este tipo de estructura, el color es generado por las capas ubicadas en el cuerpo de la escama lo cual genera una gran gama de colores en todas las familias de mariposas, además son responsables de la polarización debido a una curvatura dentro de la cavidad que contiene las capas. Los resultados más llamativos con los efectos de color y polarización ya que genera dos colores (mezclados de forma aditiva en la visión humana) y una polarización monocromática debido a las numerosas perforaciones cuando existen [54]. La Figura 5. muestra un ejemplo de arreglo estructura de tipo IV.

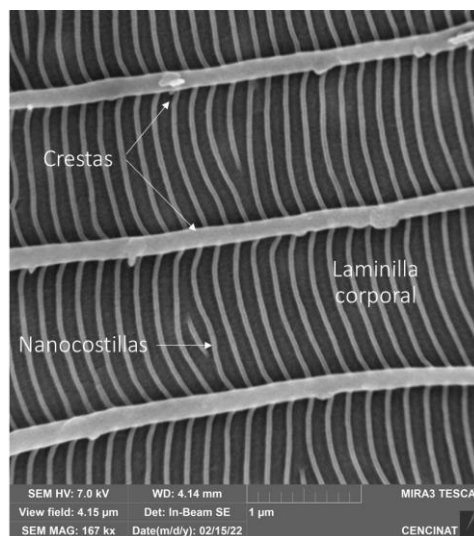


Figura 5. Nanoestructuras tipo IV

Esta categoría puede dividirse en 2 subcategorías en función de la curvatura de las laminillas corporales, las cuales son menos especializadas que aquellas del Tipo II. La más simple es aquella formada paralelamente en un perfil multicapa, mientras que la otra forma es la estructura de concavidad [47]. La curvatura de la estructura es clave para determinar color mientras que sus variaciones están asociadas al espesor de la capa. Las especies icónicas con este tipo de nanoestructura son el género *Papilio* de la familia *Papilionidae* que tienen una cubierta verde y azul verdosa en sus alas [48].

1.4. Caracterización de nanoestructuras

La caracterización de nanoestructuras y la correcta interpretación de la relación estructura-coloración dependen de la variable a analizar e implica el uso de múltiples técnicas, que incluye espectroscopía, microscopía electrónica y métodos de simulación. Primero, para identificar morfológicamente la estructura se suele utilizar la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido (SEM), técnica que permite magnificar una superficie gracias a la interacción electrón-materia [41] y, con menor frecuencia, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde las muestras pueden estar embebidas en algún tipo de resina [60].

Por otro lado, la termogravimetría (TGA) es una técnica que mide la variación de masa de una muestra a medida que se calienta, se enfría o se mantiene a temperatura constante, permitiendo la caracterización de las muestras con respecto a su composición. Esta técnica resulta útil para determinar moléculas o compuestos predominantes en las nanoestructuras, tanto de su propia formación como aquellas que están inmersas en estas [61], [62].

En cuanto a las medidas de ópticas, usualmente la reflectancia espectral se mide utilizando un equipo multicanal acoplado con ultravioleta de xenón (UV) – luz visible (VIS) [22] o con espectroscopia de rayos X como medida de transmitancia, fluorescencia y composición química [42]. Adicionalmente, los análisis ópticos están relacionados con la interacción materia-fotón en el rango de luz visible, UV y NIR, relacionados a la absorbancia, reflectancia y fluorescencia. La Tabla 1 muestra las técnicas reportadas para analizar diferentes propiedades de las alas y sus nanoestructuras.

Tabla 1. Principales técnicas de caracterización de escamas de alas de mariposas

Técnica de análisis	Especificaciones	Resultados	Ref.
Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	Longitudes de onda de 7.5 – 14 μm .	Emisividad IR media, mapeo IR	[28] [63]
Termografía IR	Longitudes de onda de 7.5 – 14 μm .	Emisividad IR media	[28]
Cámara IR	Control de la temperatura ambiental y la humedad	Fluctuaciones de calor en la muestra.	[28]
Microscopía electrónica de barrido – SEM	Caracterización estructural. Preparación de la superficie con oro.	Micrografías, características físicas, estadística, anisotropía.	[28] [43]
Espectroscopía UV-VIS	Modelo multicapa: engrosamiento o adelgazamiento de capas de quitina.	Identificación de melanina. Espectros de reflectancia, emisividad y absorptividad.	[28] [64]

Fotografía y procesamiento de imágenes	Cámara de alta definición. Ilumina el ala con una luz halógena. Procesamiento de imágenes, transformación de RGB a HSB. Transformar a escala de grises y B/N	Patrones de geometría, simetría, color y morfología fractal. Identificar diferentes tonalidades de algunos colores, colores falsos. Medida de melanización.	[18] [29] [65] [66]
Microscopía óptica	Filtro UV, excitación azul, luz polarizada, compensadores de Sénarmont y Bräce-Köhler	Fluorescencia, birrefringencia y dicroísmo lineal.	[67]
Microscopía electrónica de transmisión – TEM	Preparación de la muestra con aldehídos.	Caracterización estructural y análisis estadístico.	[68] [64] [49]
Espectrómetro de matriz de detectores y fuente de luz de halógeno/deuterio	Ángulo de iluminación aproximadamente normal con respecto a la superficie del ala.	Espectros de reflectancia	[49]
Dispersión de imágenes	Dispersómetro con espejo elipsoidal. Haz de apertura pequeña para iluminar una pequeña área de una escama (lámpara de xenón, diámetro ~ 13 μm)	Distribución angular de campo lejano.	[49] [69]
Dispersión de rayos X de ángulo pequeño de sincrotrón (SAXS)	Muestra montada perpendicular al haz de rayos X.	Cristalografía	[59]
Micro-espectrofotometría (MSP)	Fuente de luz de xenón con microscopio y espectrómetro de fibra óptica	Reflectancia y transmitancia	[69]
Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)	Caracterización estructural. Preparación de la superficie con cobertura conductora.	Morfologías 2D y estructuras. Dimensiones y distribuciones de las microestructuras que atrapan la luz.	[27]
Espectrorradiómetro o multicanal	Junto con luz ultravioleta (UV)–visible (VIS) de xenón	Reflectancia	[22]
Espectros de potencia de Fourier	Amplios intervalos de longitud de onda (300 a 800 nm)	Periodicidad de nanoestructuras y sus variaciones, iridiscencia	[70]
Microscopía de fuerza atómica	El área de 500x500 nm genera mapas de 64x64 píxeles. Fuerza máxima durante la formación de imágenes: 10 nN.	Caracterización de superficies: módulo elástico, adherencia, hidrofobicidad, topografía y fuerza-desplazamiento	[71]

2. METODOLOGÍA

2.1. Especímenes

Se seleccionaron doce especies de la colección de mariposas del Museo de Zoología QCAZ de la Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), las cuales fueron colectadas en el Bosque Tropical de la región biogeográfica del Chocó ecuatoriano, en la Reserva Río Canandé, ubicado en la provincia de Esmeraldas (00°280S, 79°120W), considerado uno de los 21 *hotspots* globales de biodiversidad y endemismo [72]. Las especies formaron parte de un proyecto previo de investigación que llevó a cabo la PUCE en relación a investigaciones morfológicas de alas de mariposas durante 2012-2016.

El criterio de selección de las especies fue su vuelo predominante en un estrato específico del bosque y la abundancia relativa de las mismas. La distribución vertical de las especies ha sido analizada por Mena (2020) quien determinó la predominancia o preferencia de las especies con un modelo bayesiano jerárquico en el mismo bosque de estudio. El índice de estratificación se encuentra en el rango de 0 a 1, mientras más cercado sea el valor a 1, se considera mayor preferencia por el dosel, mientras que, si el índice tiende a 0, la especie presenta predominancia en el sotobosque.

La Tabla 2 muestra las especies seleccionadas por estrato de bosque y el Anexo 1 muestra las macrofotografías de las alas anterior y posterior de cada especie en vista dorsal y ventral.

Tabla 2. Especies de mariposas seleccionadas para el estudio

No.	Especie	Índice de estratificación	Estrato de bosque
1	<i>Hamadryas amphinome</i>	0.97	Dosel
2	<i>Heliconius hecalesia</i>	0.94	Dosel
3	<i>Adelpha erotia</i>	0.92	Dosel
4	<i>Smyrna blomfieldia</i>	0.95	Dosel
5	<i>Dryas iulia</i>	0.49	Estrato medio
6	<i>Manataria maculata</i>	0.48	Estrato medio
7	<i>Archaeoprepona demophon</i>	0.55	Estrato medio
8	<i>Colobura annulata</i>	0.50	Estrato medio
9	<i>Caligo atreus</i>	0.01	Sotobosque
10	<i>Heliconius erato</i>	0.01	Sotobosque
11	<i>Catoblepia orgetorix</i>	0.08	Sotobosque
12	<i>Pierella helvina</i>	0.05	Sotobosque

En el bosque de donde se tomaron las muestras, la variabilidad de temperatura entre sotobosque y dosel que alcanza los 20-30m, puede ser alrededor de 4 a 10°C; mientras

que la disponibilidad de luz en el sotobosque es del 1% de la luz disponible en el dosel [6]. La figura 6 muestra de manera esquemática la distribución de las especies analizadas de acuerdo a su predominancia de vuelo en el estrato de bosque.



Figura 6. Distribución de las especies colectadas de acuerdo a la estratificación de bosque.
Fuente: Elaboración propia

2.2. Caracterización de las alas

Microscopía óptica

Para la observación en microscopía óptica se empleó un microscopio marca Motic modelo BA310 adaptada con cámara de 5 Mpx. Se realizó la observación de las alas anteriores y posteriores con aumento de 10 y 40X. Para ello, se tomó un área de 3x3 mm², aproximadamente, la cual fue iluminada desde arriba con luz LED blanca auxiliar. Tanto de alas anteriores como posteriores, se realizó la observación de una porción de ala de la zona discal por representar la mayor concentración de color y/o escamas.

Microscopía electrónica de barrido

Se empleó un microscopio electrónico de barrido SEM Tescan Mira 3 con el cual se obtuvieron micrográficas de las alas completas tanto anterior como posterior y, secciones específicas de las mismas: zonas apical-subapical, discal y basal-postbasal para alas anteriores y, marginal-submarginal, discal y basal-subdiscal de alas posteriores, como se indica en la Figura 7.

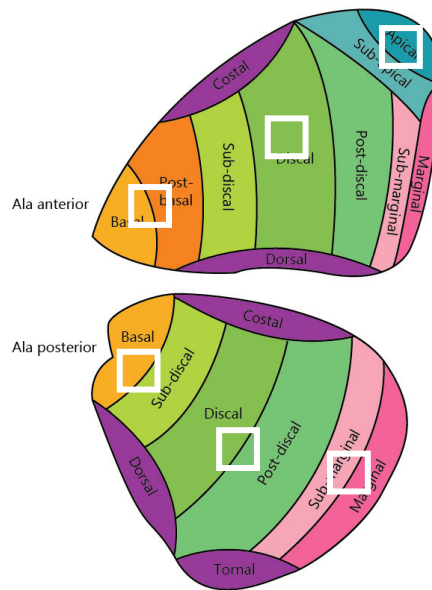


Figura 7. Zonas de las alas analizadas espectral y microscópicamente.
Fuente: Elaboración propia

Para el ala completa, esta se fijó a una placa portaobjetos usando cinta conductora de carbono doble faz. Se empleó un evaporador de oro Quorum Q150R ES para recubrir la muestra con una capa de oro (99.99% pureza) de 20nm de espesor, aproximadamente. La muestra fue introducida al microscopio equipado con un emisor de campo tipo Schottky y las observaciones se realizaron a 7kV.

Para las microscopías seccionales, las partes seleccionadas fueron fijadas a portamuestras para SEM de aluminio con cinta conductora de carbono. Luego, fueron fijadas nuevamente con cinta de plata exponiendo solo el área central de la sección, como se muestra en la Figura 8. A continuación, fueron recubiertas con oro con una capa de 20nm de espesor, aproximadamente y, se realizaron observaciones a 7kV con 3 diferentes magnificaciones hasta 350kx, dependiendo del enfoque logrado en cada muestra.



Figura 8. Ubicación en portamuestras para observación en SEM

Espectroscopía con escáner multiespectral

El análisis óptico se realizó con un escáner bidimensional multiespectral construido a partir de un ensamble óptico-electrónico-mecánico como parte de un trabajo de titulación de pregrado en la EPN. Este instrumento permite capturar la reflectancia difusa descompuesta espectralmente de la muestra analizada en cada uno de los 10 canales que lo componen. Además, el escáner permite reconstruir imágenes en diez bandas espectrales mediante un juego de luces LED que cubren un rango desde 375 nm a 910 nm, es decir, desde ultravioleta a infrarrojo cercano, pasando por todo el rango de luz visible, además de la fluorescencia. La Figura 9 muestra el escáner en posición para toma de datos.

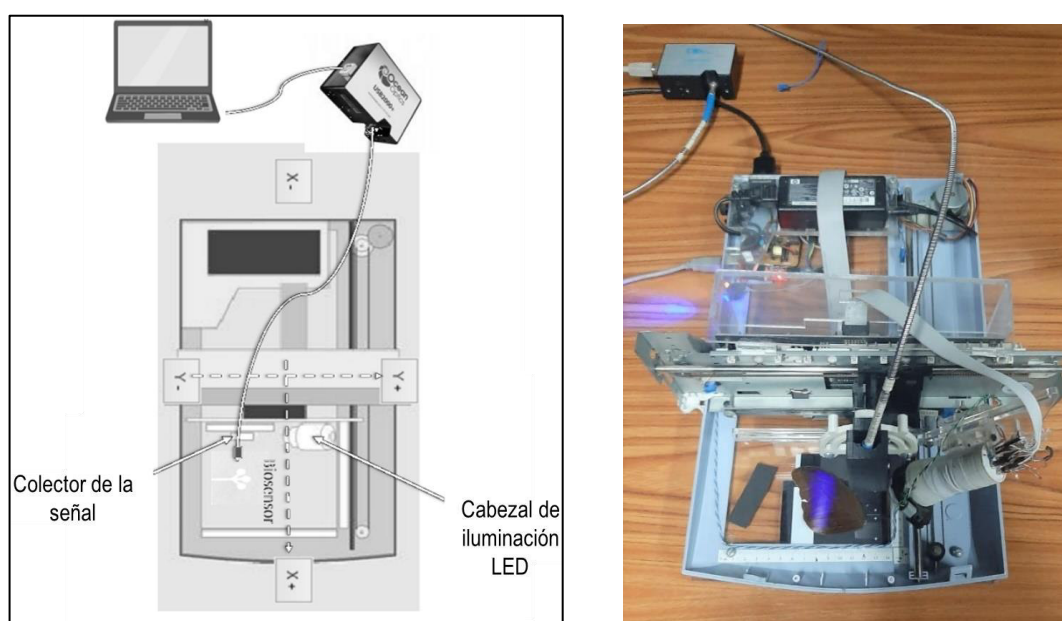


Figura 9. Esquema general y fotografía del escáner multiespectral

El procesamiento de las imágenes implica la reconstrucción pixel a pixel para identificar composiciones de color, reflexión difusa causada por fluorescencia y características relevantes en el NIR [73]. Las mediciones se realizaron en cuarto oscuro escaneando toda el área de cada ala anterior y posterior de las especies seleccionadas, con una resolución de 428 μm por lado.

Para el cálculo de las variables espectrales, se realizó una combinación de los canales dentro de los rangos de luz UV (375nm), visible (435, 475, 525, 590 y 625 nm) y NIR (700, 760, 810 y 940 nm). Los datos resultantes de la espectroscopía multicanal fueron analizados en el software Wolfram Mathematica® V12.3. El código desarrollado para el análisis de los datos se adjunta en el Anexo 2.

Termogravimetría

El análisis termogravimétrico permite caracterizar térmica y químicamente las muestras gracias a la estimación de la temperatura de descomposición de moléculas químicas. Para definir la composición de las alas se aplicó un ensayo TGA en un equipo marca Mettler Toledo Modelo TGA 2 el cual se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Equipo TGA empleado para los análisis

Para realizar los análisis, se trabajó con las siguientes condiciones: modo: dinámico, temperatura inicial: 25°C, temperatura final: 600°C, velocidad de calentamiento: 10°C/min, con atmósfera de nitrógeno a 50ml/min. Adicionalmente, se emplearon celdas portamuestras de alúmina de 70uL, la resolución de la balanza fue de 0.1/1µg, con una precisión de pesaje de 0.005%. El rango de temperatura empleado es el estándar para estructuras biológicas formadas de quitina ya que permite identificar los porcentajes de masas en cada tipo de moléculas de quitina. El ensayo se aplicó tanto en alas anteriores como posteriores de las especies seleccionadas y muestra fases de descomposición molecular por variación de masa de la muestra.

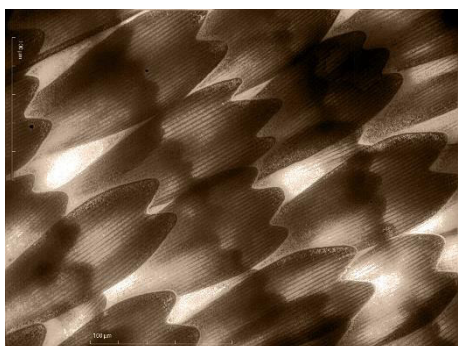
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de nanoestructuras

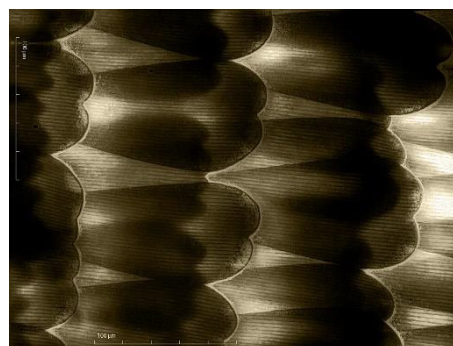
Microscopía óptica

Se obtuvieron 2 microscopías por especie correspondientes al ala anterior y posterior. En las microscopías se observa la distribución general de las escamas tanto terrestres como de cobertura y, el número de puntas predominantes, las cuales son caracterizadas en detalle con la microscopía SEM. La Figura 11 muestra las micrografías ópticas resultantes de *Manataria maculata* en 40X, las micrografías de las demás especies con aumento 10X y 40X se encuentran en el Anexo 3.

a)



b)

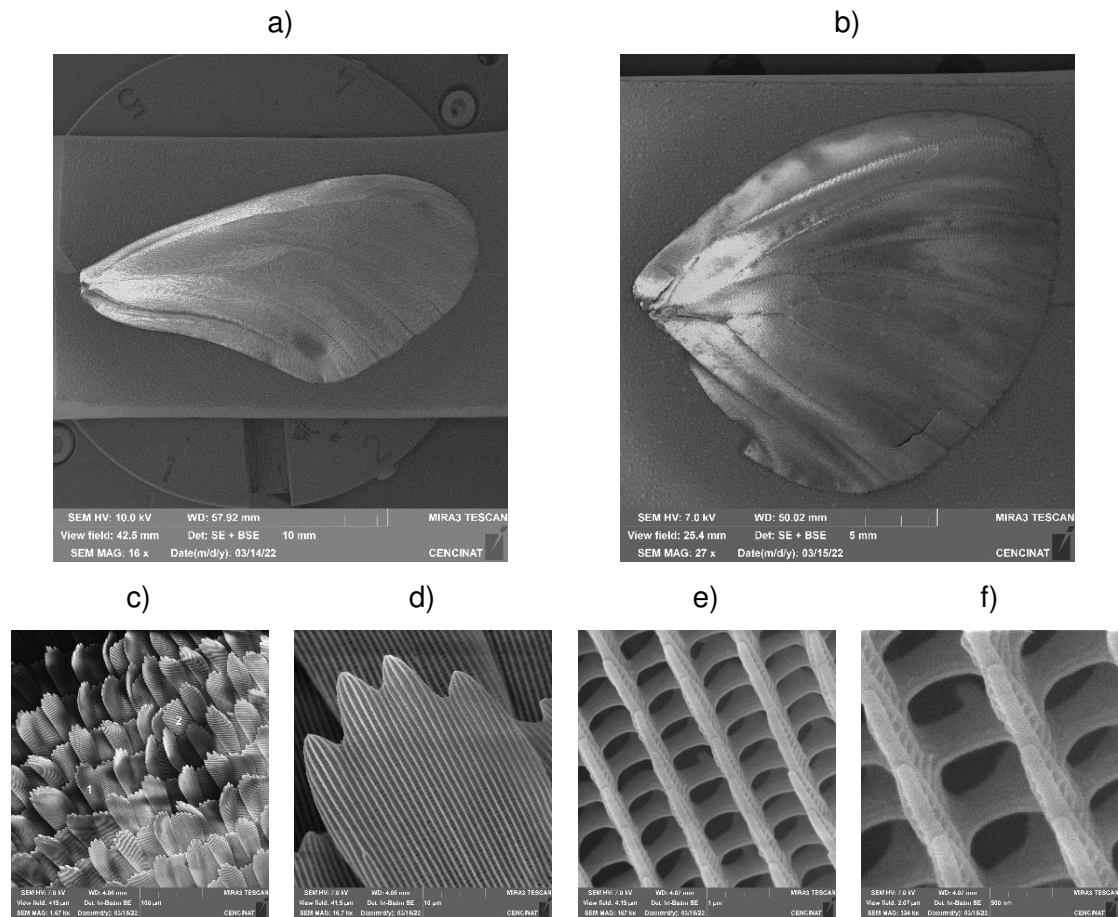


Micrografías ópticas en aumento 40X de zona discal de *Manataria maculata*. a) ala anterior, b) ala posterior.

Figura 11. Micrografías ópticas.

Microscopía electrónica de barrido

Las micrografías de SEM permitieron caracterizar las micro y nanoestructuras de las escamas de las alas de acuerdo con la clasificación descrita en la sección 1.3 del presente documento. De cada especie, se obtuvieron las micrografías del ala anterior y posterior completas y de las tres secciones del ala descritas, cada una con 3 magnificaciones como se muestra en la Figura 12, lo cual permite identificar la disposición general de las escamas y nanoestructuras predominantes. Las micrografías completas se encuentran en el Anexo 4.



Micrografías generadas para *Heliconius erato*. a) Micrografía ala anterior completa; b) Micrografía ala posterior completa; c) Micrografía sección discal a 1.67kx de magnitud; d) Micrografía sección discal a 16.7kx de magnitud; e) Micrografía sección discal a 167kx de magnitud; f) Micrografía sección discal a 267kx de magnitud.

Figura 12. Micrografías obtenidas por cada especie analizada

Las micrografías fueron analizadas y descritas de acuerdo a la clasificación de nanoestructuras contempladas en la sección 1.3 de este documento. A continuación, se detalla una descripción general de las nanoestructuras predominantes en las especies analizadas de cada estrato. El Anexo 5 recoge la descripción detallada de cada zona de las alas de cada especie. Cabe aclarar que la mayoría de las alas y sus respectivas zonas presentan varios tipos de nanoestructuras de manera simultánea por lo que se ha optado por describir cada tipo de nanoestructura que se ha identificado en cada zona.

- Especies de dosel

Para las especies de dosel tanto en alas anteriores como posteriores se observa nanoestructuras predominantemente del tipo I, seguidas del tipo IV. Sin embargo, la característica esencial de la arquitectura de las escamas es la presencia de ventanas

muy amplias, uniformes y casi de cresta a cresta con nanocostillas cortas que no sobrepasan las costillas transversales dejando las crestas no muy pronunciadas.

- Especies de estrato medio

Al igual que en las especies de dosel, se observa predominancia de nanoestructuras tipo I seguidas de tipo IV. A diferencia de estas, las ventanas entre crestas son menos amplias y menos uniformes, con costillas más largas lo que hace a las crestas más pronunciadas.

- Especies de sotobosque

Presentan predominancia de nanoestructuras tipo IV y tipo I. En todos los casos, las ventanas son más reducidas que en las especies de los otros estratos, con una amplitud que no van de cresta a cresta, las crestas se muestran más prominentes (más altas) con laminillas más anchas y pronunciadas que en las nanoestructuras de del resto de las especies.

Espectroscopía con escáner multiespectral

Se obtuvieron formaciones espectrales resultantes del escaneo óptico de las alas completas de cada especie, excepto de *Caligo atreus* que fue escaneada por secciones debido al tamaño de las alas. La Figura 13 muestra la formación espectral resultante del escaneo completo del ala anterior de *Colobura annulata*.

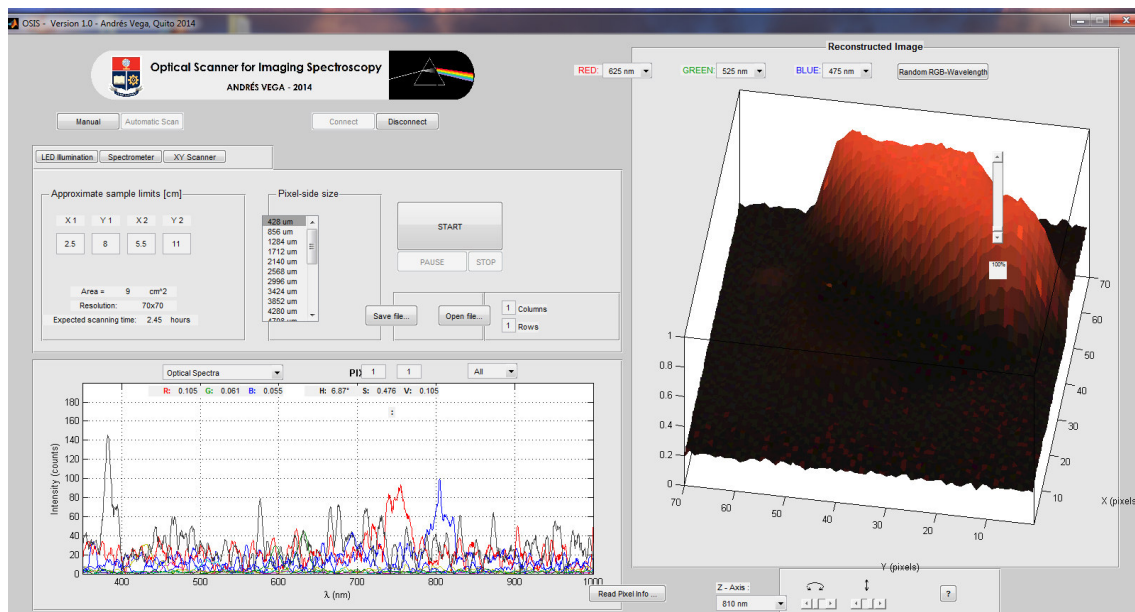


Figura 13. Formación espectral resultante del ala anterior de *Colobura annulata*

Una vez obtenidos los datos del escáner, estos fueron cargados el software Wolfram Mathematica con el cual se realizó una reconstrucción de imágenes como se indica en la Figura 14.

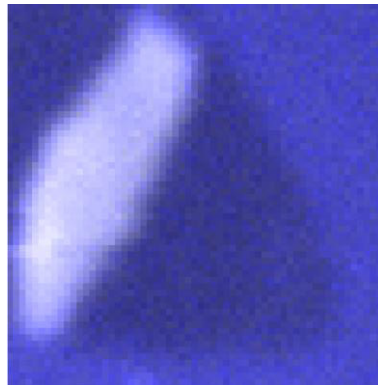


Figura 14. Reconstrucción de imagen del ala anterior de *Colobura annulata*

De las imágenes reconstruidas, se seleccionaron 3 áreas específicas de 25mm², tal como se indicó en la Figura 6, las cuales coinciden con las zonas analizadas mediante SEM.

De estas zonas se obtuvieron los espectros de reflectancia difusa para UV, Vis y NIR como se observa en la Figura 15. Los gráficos muestran en el eje de las abscisas la longitud de onda vs. la intensidad en el eje de las ordenadas. Los espectros de cada especie por ala y área analizada se compilan en el Anexo 6.

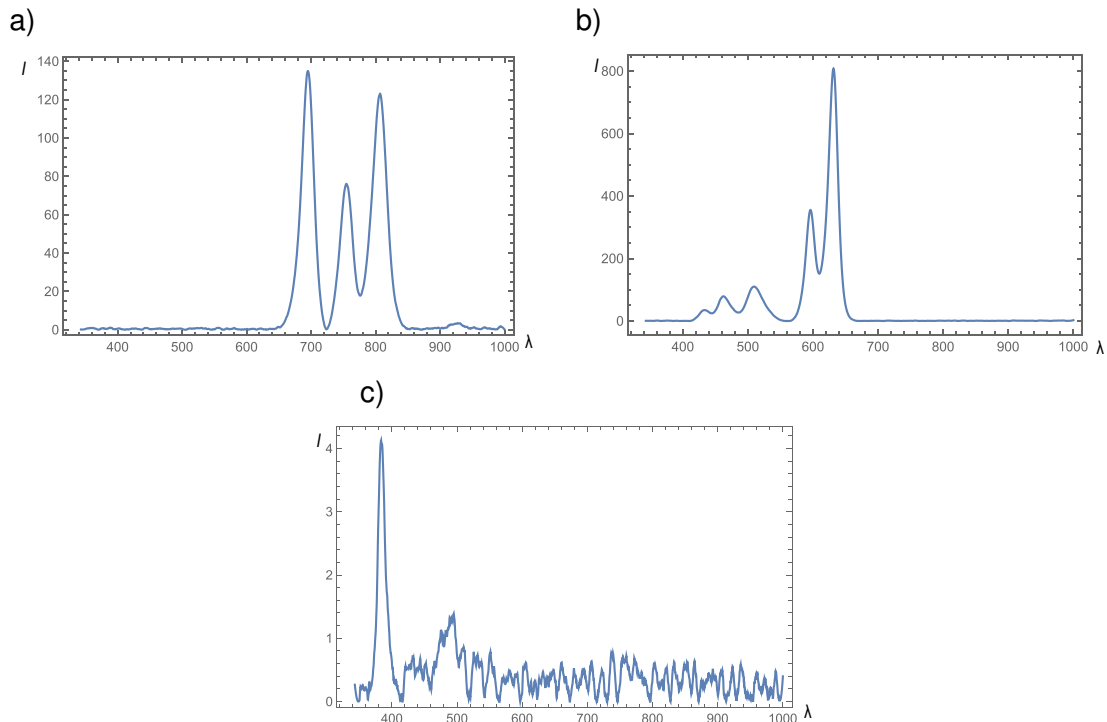


Figura 15. Espectros de la zona apical del ala anterior de *Colobura annulata*. a) Visible, b) Infrarrojo cercano, c) UV

El código empleado generó espectros en el rango NIR, Vis y UV por cada zona, además se obtuvo el área bajo la curva con ajuste de ruido en el background e índices de reflectancia según las ecuaciones (1), (2) y (3).

$$\text{Índice UV} = \frac{\text{área UV}}{\text{área UV} + \text{área Vis} + \text{área NIR}} \quad (1)$$

$$\text{índice Vis} = \frac{\text{área Vis}}{\text{área UV} + \text{área Vis} + \text{área NIR}} \quad (2)$$

$$\text{índice NIR} = \frac{\text{área NIR}}{\text{área UV} + \text{área Vis} + \text{área NIR}} \quad (3)$$

La Tabla 3 muestra los índices en los 3 rangos del espectro electromagnético de cada especie, para las alas anteriores y posteriores, y la Figura 16 su correspondiente representación gráfica.

Tabla 3. Índices de relación NIR, Vis y UV

Estrato	Especie	Ala anterior			Ala posterior		
		Índice NIR	Índice Vis	Índice UV	Índice NIR	Índice Vis	Índice UV
Dosel	<i>H. amphinome</i>	0,2827	0,6604	0,0569	0,3567	0,6243	0,0191
	<i>H. hecalesia</i>	0,3180	0,6486	0,0334	0,3535	0,5999	0,0466
	<i>A. erotia</i>	0,3377	0,6207	0,0416	0,2658	0,6800	0,0535
	<i>S. blomfildia</i>	0,3831	0,5802	0,0367	0,3547	0,6330	0,0122
Estrato medio	<i>D. iulia</i>	0,3421	0,6396	0,0183	0,3211	0,6575	0,0214
	<i>M. maculata</i>	0,4141	0,5507	0,0352	0,3411	0,6334	0,0254
	<i>A. demophon</i>	0,3474	0,5693	0,0833	0,1841	0,7524	0,0635
	<i>C. annulata</i>	0,3005	0,6828	0,0167	0,3599	0,6111	0,0290
Sotobosque	<i>C. atreus</i>	0,3276	0,5637	0,1088	0,4766	0,4572	0,0663
	<i>H. erato</i>	0,3815	0,5423	0,0762	0,3584	0,5607	0,0810
	<i>C. orgetorix</i>	0,4621	0,4688	0,0690	0,4177	0,5251	0,0572
	<i>P. helvina</i>	0,3786	0,5712	0,0503	0,4307	0,5193	0,0500

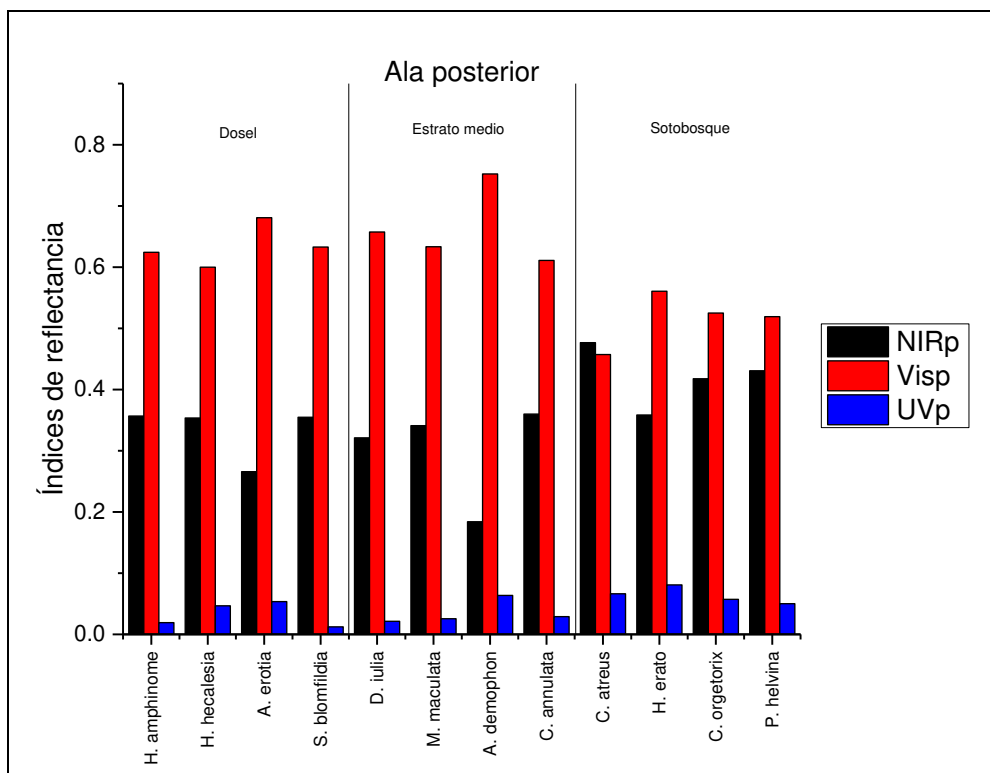
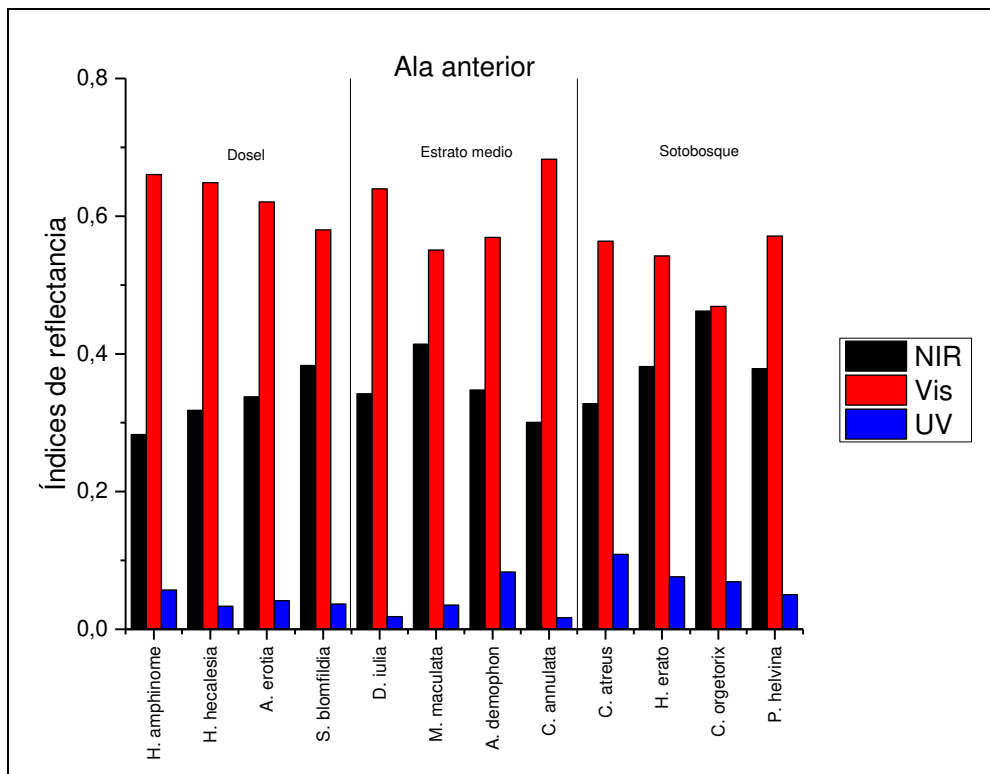


Figura 16. Distribución de índices de reflectancia NIR, Vis y UV

Con los datos generados, se realizaron los siguientes análisis estadísticos en el software Statgraphics Centurion® XVI y en PAST® 4.09.:

- Comparación entre grupos

Se realizaron análisis estadísticos comparativos entre grupos (por estrato de bosque) para cada rango de luz considerado, tomando los datos tanto de las alas anteriores como posteriores, ya que cada ala (de todas las especies) fueron analizadas en los 3 rangos de luz (NIR, Vis y UV). Para definir qué test aplicar en cada análisis, se aplicó el test de Shapiro-Wilk con la finalidad de determinar la normalidad de los residuales, lo cual se recoge en la Tabla 4.

Tabla 4. Test de Shapiro-Wilk para cada conjunto de datos

Grupos	Shapiro-Wilk W	p (normal)	Test estadístico
Datos NIR	0,9139	0,0001	Kruskal-Wallis + post hoc de Dunn
Datos Vis	0,9735	0,132	ANOVA + post hoc de Tukey
Datos UV	0,9066	5,66E-5	Kruskal-Wallis + post hoc de Dunn

Rango NIR

Al aplicar la Prueba de Kruskal-Wallis para medianas iguales se obtuvo un H (χ^2) de 12,89 cuyo valor-p es de 0,0001 lo que indica que si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos seleccionados. De acuerdo con el post hoc de Dunn, las diferencias se darían entre los conjuntos de datos del NIR de dosel y de estrato medio en comparación con los de sotobosque. La Tabla 5 muestra qué conjuntos de datos presentan las diferencias relevantes.

Tabla 5. Post hoc de Dunn para el rango NIR

	NIR_Dosel	NIR_Medio	NIR_Soto
NIR_Dosel		0,639	0,001
NIR_Medio	0,639		0,004
NIR_Soto	0,001	0,004	

Esta comparación puede observarse en la Figura 17 en el gráfico de cajas y bigotes el cual muestra con una cruz roja la media de los datos y con una línea azul vertical la mediana de los mismos y permite identificar visualmente la semejanza entre los datos de los estratos dosel y medio.

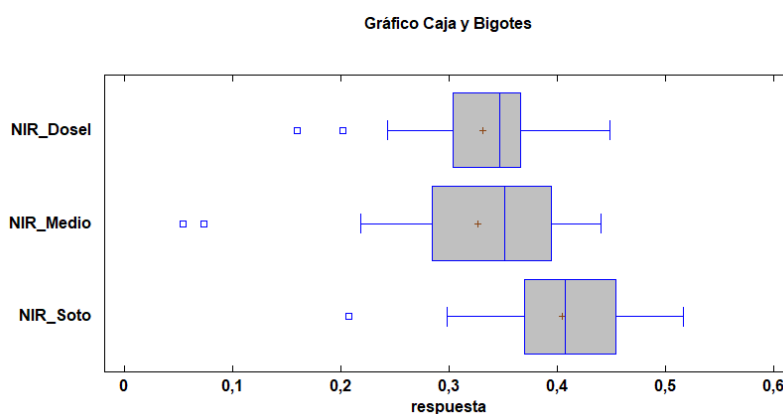


Figura 17. Gráfico de cajas y bigotes para el rango NIR.

Rango visible

En el rango visible, se aplicó un test ANOVA cuya una razón-F es de 12,38 y valor-p es de 2.55E-5 lo que indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95,0% de confianza. De acuerdo con el post hoc de Tukey, existen diferencias entre los conjuntos de datos de Dosel y Estrato medio respecto de los datos de sotobosque para este rango de luz, lo cual se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Post hoc de Tukey para el rango visible

	Vis_Dosel	Vis_Medio	Vis_Soto
Vis_Dosel		0,968	0,0002
Vis_Medio	0,3448		0,0001
Vis_Soto	5,914	6,259	

La Figura 18 muestra el gráfico de cajas y bigotes para los tres estratos en el rango visible. De manera similar a los resultados para el rango NIR, el gráfico muestra visualmente la similitud de los datos para los estratos dosel y medio, sin embargo, tanto la media como la medida del conjunto de datos de sotobosque se encuentran fuera del rango considerado como similar.

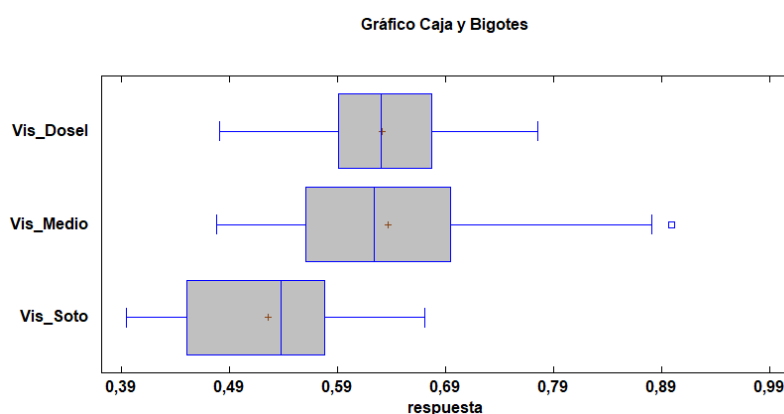


Figura 18. Gráfico de Cajas y Bigotes para el rango Vis

Rango UV

La Prueba de Kruskal-Wallis aplicada para el rango UV muestra un estadístico H (χ^2) de 16,31 cuyo valor- p es de 0,0002, lo cual evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los tres grupos analizados. El post hoc de Dunn muestra que, al igual que en los otros casos, existen diferencias estadísticamente significativas entre los conjuntos de datos de dosel y sotobosque y de estrato medio y soto bosque. En la Tabla 7 se pueden observar los posts hoc para los datos analizados.

Tabla 7. Post hoc de Dunn para rango UV

	UV_Dosel	UV_Medio	UV_Soto
UV_Dosel		0,934	0,001
UV_Medio	0,934		0,0004
UV_Soto	0,001	0,0004	

En la Figura 19 se observa el gráfico de cajas y bigotes para el rango UV, el cual también muestra la similitud de los datos de dosel y medio por la ubicación tanto de la media como de la mediana, dejando por fuera el conjunto de datos de sotobosque.

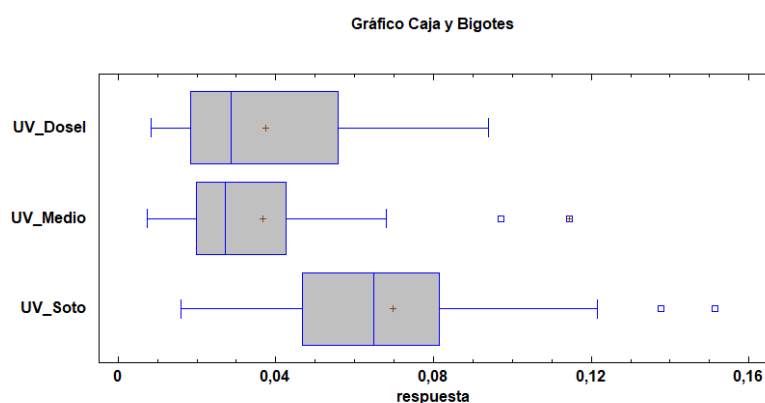


Figura 19. Gráfico de cajas y bigotes para el rango UV

- Correlación con índice de estratificación

Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los índices promedio generados por espectroscopía en los rangos NIR, Vis y UV con los índices de estratificación de cada especie determinados de acuerdo a la predominancia de vuelo. Este análisis reveló que existen una correlación con significancia estadística entre el índice de estratificación y los 3 rangos de luz con 95% de confianza. Los resultados del valor-*p* de la correlación además revelan que existen una correlación significativa entre los índices de NIR y Visible. Estos resultados se observan en la Tabla 8.

Tabla 8. Valor-*p* de la correlación de Pearson entre índice de estratificación e índices por rango de luz.

	Índice est.	NIR	VIS	UV
Índice est.	-	0,0242	0,0029	0,0399
NIR		-	1,99E-5	0,5251
VIS			-	0,0545

La correlación existente entre el índice de estratificación y los índices de reflectancia NIR, Vis y UV muestran tendencias lineales generales a pesar de presentar valores atípicos. Es así que, se muestra que mientras mayor sea el índice de estratificación (vuelo más cercado hacia el dosel) de las mariposas, sus alas presentan mayor

reflectancia en el rango visible pero menor reflectancia en los rangos UV e infrarrojo cercano. Esta relación puede observarse en la Figura 20.

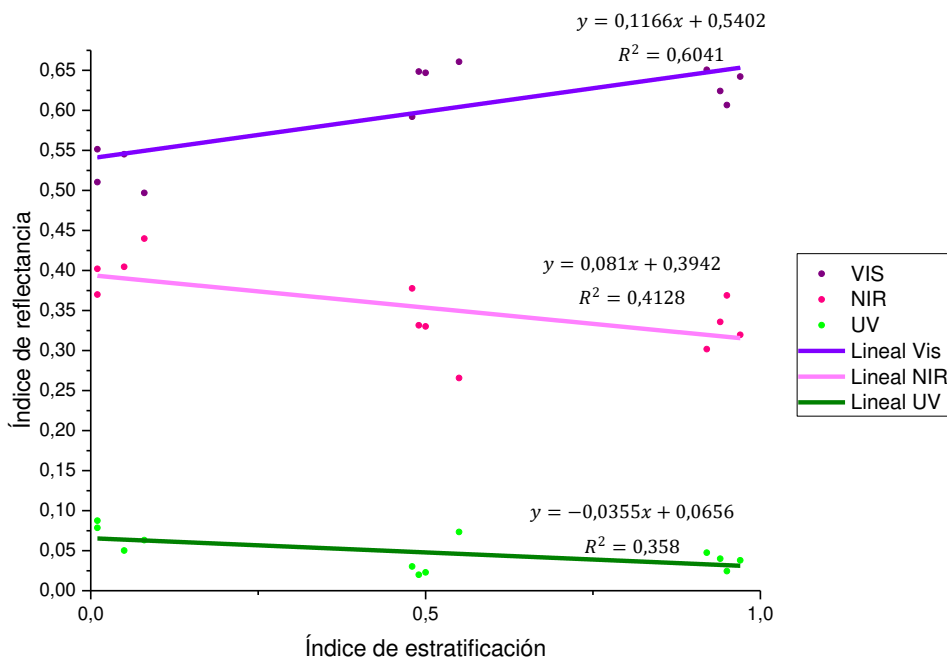
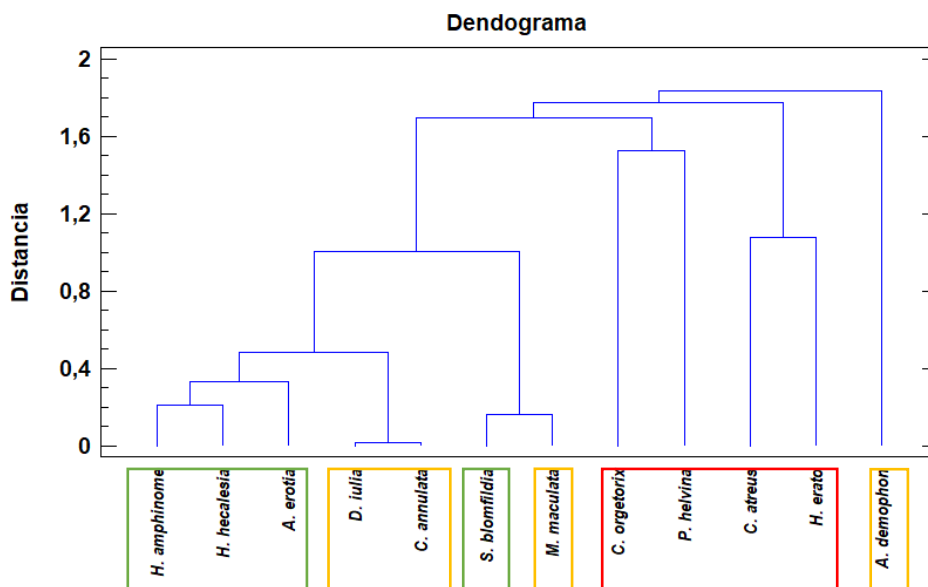


Figura 20. Índices de reflectancia NIR, Vis y UV vs. Índices de estratificación

Finalmente, se realizó un análisis de conglomerados de acuerdo a los índices totales de los rangos analizados, lo cual permitió generar el dendrograma de la Figura 21 que permite visualizar el vecino más cercano entre las especies mediante el método de euclídeana cuadrada. Este diagrama permite identificar la similitud de comportamiento en relación a los índices de reflectancia en su totalidad (NIR, Vis y UV).



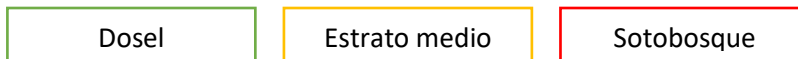


Figura 21. Dendrograma de las especies analizadas en función de los índices Vis, NIR y UV

Como se puede observar, el dendrograma agrupa con exactitud a las especies de sotobosque, sin embargo, las especies de dosel y estrato medio están mezcladas y cercanas entre ellas, lo que resulta coherente con los resultados obtenidos en el análisis comparativo por rangos de luz.

Termogravimetría

La Figura 22 presenta una de las termografías obtenidas durante los ensayos, las termografías de cada ala y especie se encuentran en el Anexo 7.

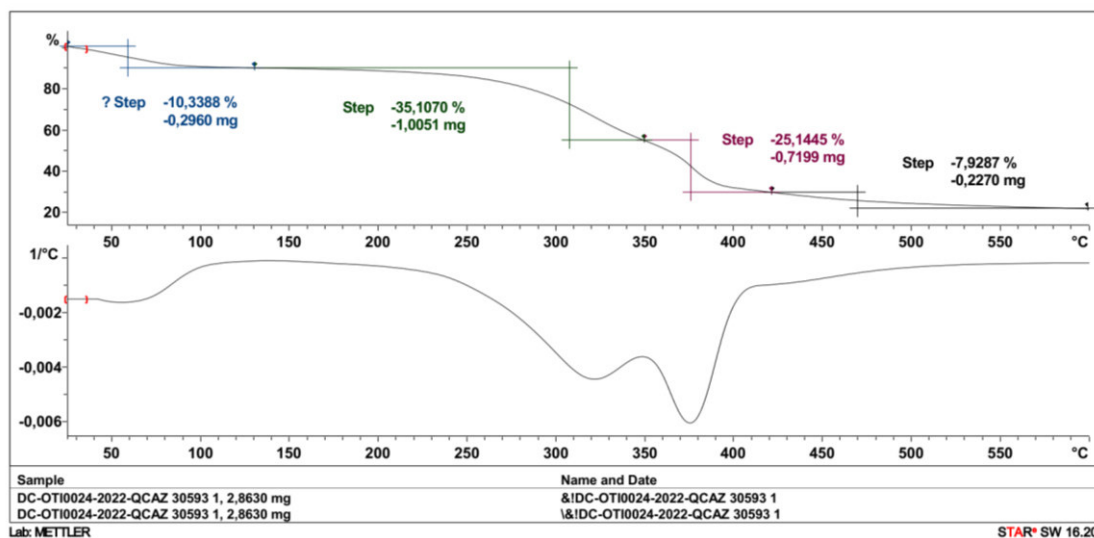


Figura 22. Termografía de *Hamadryas amphinome*

A continuación, la Tabla 9 muestra los datos de pérdida de masa generales de cada ala para todas las especies analizadas.

Tabla 9. Pérdida general de masa en porcentaje por rango de temperatura

Ala	Rango de temperatura			
	40 a 100°C	100 a 350°C	350 a 430°C	430 a 600°C
Anterior	11.41±1.35	35.72±3.78	23.55±2.17	9.43±4.52
Posterior	12.11±1.74	36.89±3.11	23.39±2.15	10.41±4.43

Las termografías resultantes muestran la pérdida de masa en cuatro fases principales correspondientes a cuatro rangos de temperatura. La primera fase de pérdida de masa se atribuye a la evaporación de agua [62] presente en las alas y encapsulada en las nanoestructuras. En este rango, se aprecia una pérdida de masa general de 11.41±1.35

y 12.11 ± 1.74 para ala anterior y posterior, respectivamente. Las especies *Heliconius hecalesia*, *Pierella helvina* y *Caligo atreus* presentan mayor pérdida de masa.

La segunda fase de pérdida de masa corresponde al rango de temperatura de 100 a 350°C en el cual se aprecia una pérdida de masa general del 35.72 ± 3.78 para el ala anterior y, 36.89 ± 3.11 para el ala posterior. Las especies que registran mayor pérdida de masa son las mismas que en el primer rango. La pérdida de masa en este rango de temperatura se atribuye a la degradación de la quitina- β mientras que la tercera fase, de 350 a 430°C corresponde a quitina- α [74] donde se observa una pérdida de masa general de 23.55 ± 2.17 y 23.39 ± 2.15 para ambas alas. en este tercer rango, las especies que presentan mayor pérdida de masa son *Smyrna blomfieldia*, *Heliconius erato* y *Adelpha erotia*.

Finalmente, en el rango de 430 a 600°C la mayor pérdida de masa corresponde a las especies *Smyrna blomfieldia*, *Colobura annulata* y *Dryas iulia*. La pérdida de masa general es de 9.43 ± 4.52 para el ala anterior y 10.41 ± 4.43 para la posterior y es atribuida a la degradación de la quitina- γ o estructuras de quitina α y β más comprimidas [75]. La Figura 23 presenta la pérdida de masa para el ala anterior y posterior de cada especie.

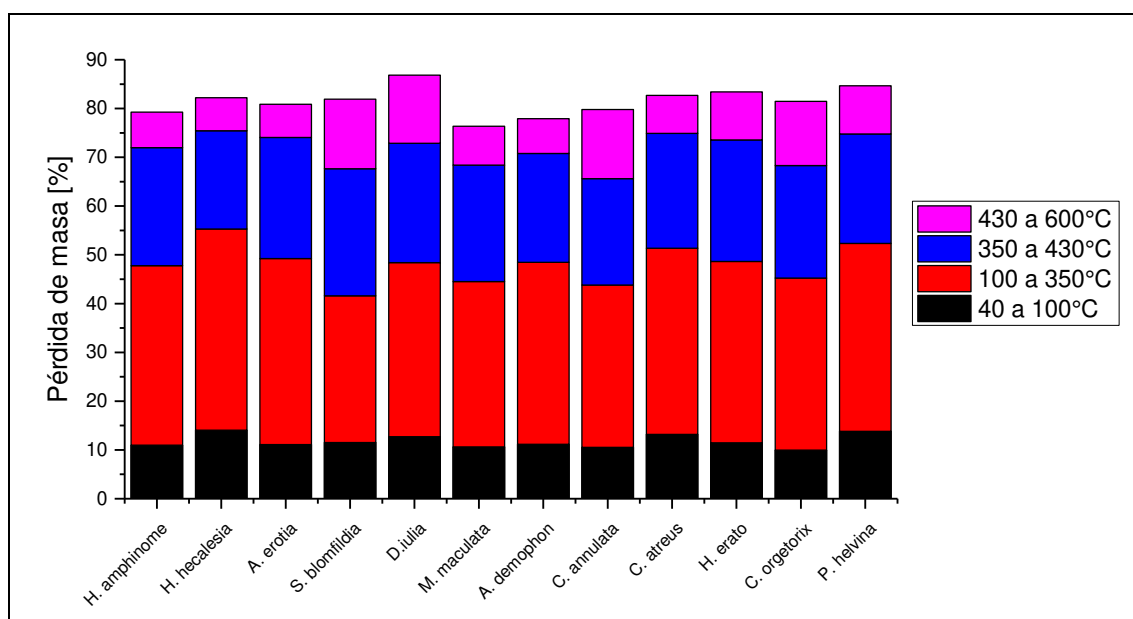


Figura 23. Pérdida de masa de las muestras analizadas

Este ensayo es relevante ya que permite cuantificar el material necesario para desarrollar los diferentes tipos de nanoestructuras

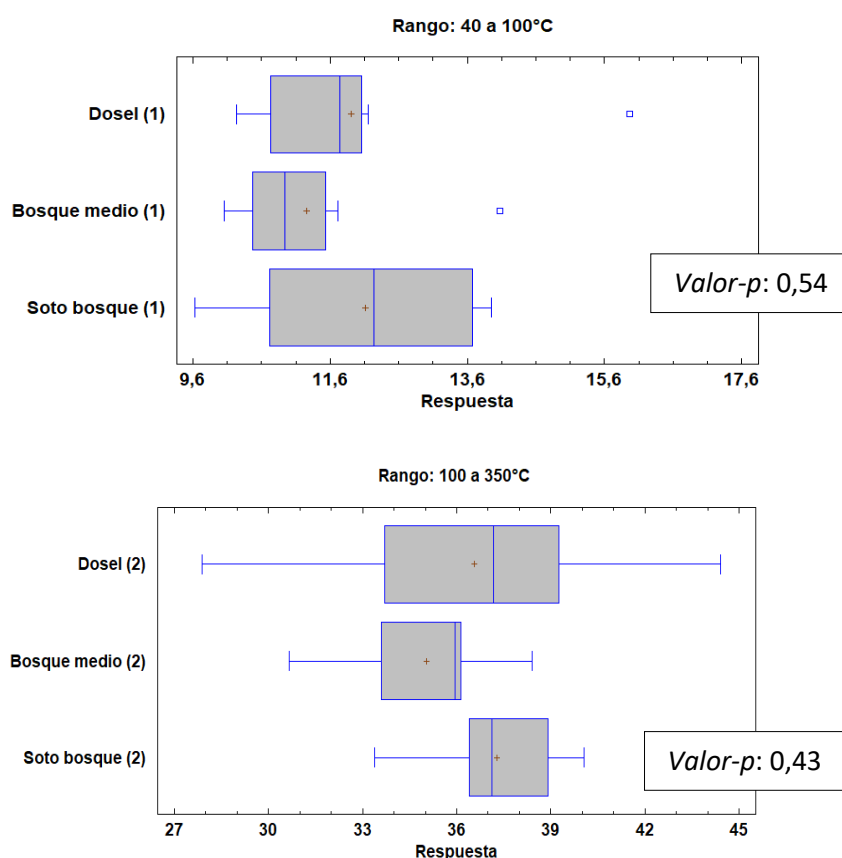
- Análisis estadístico

Aplicando el test de Shapiro-Wilk se determinó la naturaleza de los datos para aplicar el análisis estadístico mejor ajustado. La Tabla 10 muestra el test de Shapiro-Wilk para cada conjunto de datos del TGA.

Tabla 10. Test de Shapiro-Wilk para datos TGA

Grupos	Shapiro-Wilk W	p (normal)	Test estadístico
40-100°C	0,9419	0,1794	ANOVA + post hoc de Tukey
100-350°C	0,9461	0,2223	ANOVA + post hoc de Tukey
350-430°C	0,9624	0,4880	ANOVA + post hoc de Tukey
430-600°C	0,7453	4,2E-5	Kruskal-Wallis + post hoc de Dunn

Los resultados de los test aplicados muestran que para ningún rango de temperatura analizado existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados de porcentaje de pérdida de masa ni entre grupos ni dentro de grupos con un nivel del 95% de confianza. La Figura 24 muestra los resultados en gráficas de cajas y bigotes para cada rango de temperatura.



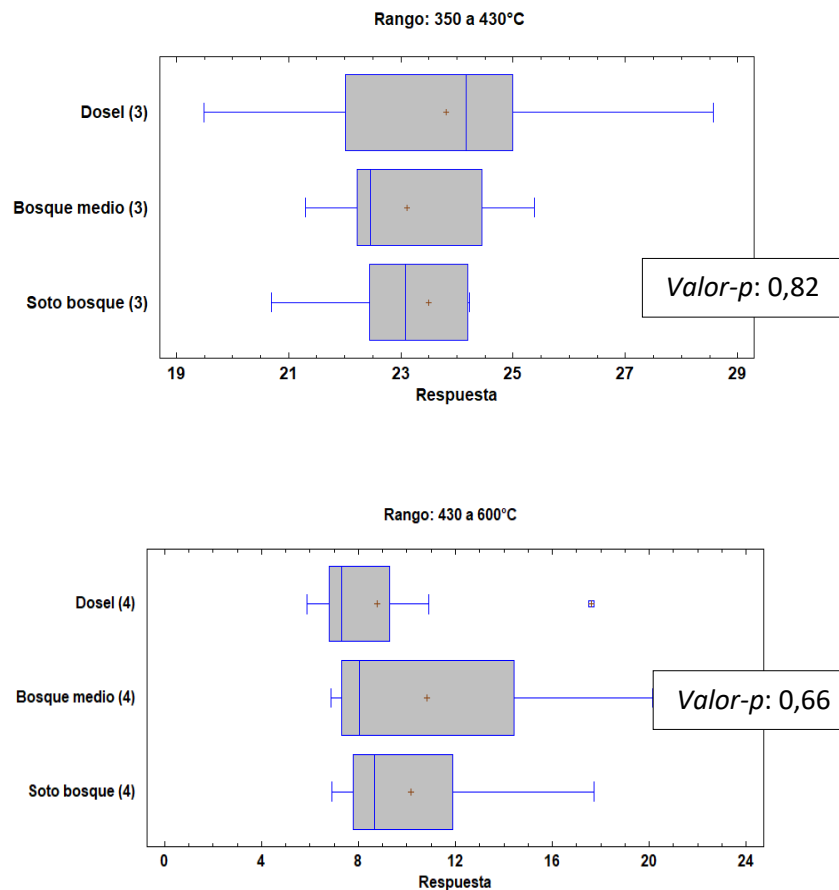


Figura 24. Gráficas de cajas y bigotes para cada rango de temperatura según estrato de bosque

Como se puede observar, para todos los rangos de temperatura analizados, los gráficos de cajas y bigotes permiten visualizar la similitud de la respuesta estadística tanto para las medias como para las medianas, corroborando que no se puede rechazar la hipótesis nula que corresponde a que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los conjuntos de datos analizados.

3.2. Discusión

Durante los últimos 30 años ha habido un progreso significativo en el estudio de las propiedades físicas de estructuras biológicas, con análisis importantes sobre las características de las alas de mariposas [45]. Sin embargo, aún ahora existen opiniones y estudios contradictorios en cuanto a la influencia e interacción que tienen las nanoestructuras alares con distintos rangos del espectro electromagnético cuya respuesta e importancia biológica no es solo óptica, sino también térmica [37].

De acuerdo con los resultados de este estudio se sugiere que, en general las alas de las especies analizadas muestran mayor reflectancia difusa en el rango visible, seguido

del NIR y luego de UV. Por una parte, la absorción en el rango UV puede estar relacionada a la presencia de proteínas como la tirosina, precursora de la quitina [76] o de pigmentos derivados de pterina [77], sin embargo, también existe una interacción con la arquitectura de las escamas de las alas ya que, al tener un comportamiento similar al de un cristal fotónico, pueden modificar significativamente la penetración de la luz con longitud de onda a partir del azul hasta el UV [76]. En este trabajo se observó que las especies de sotobosque muestran mayor reflectancia en el UV que las especies de estrato medio y dosel, esto indicaría que existe una menor absorbancia, lo cual también podría estar relacionado a la disponibilidad que existe ya que se estima que menos del 3% del espectro solar que llega a la superficie terrestre corresponde a este rango [76] y quizás menos aún dentro del bosque.

Respecto de las nanoestructuras observadas, en general, las escamas muestran una configuración anisotrópica formadas por canales largos que constituyen las crestas de las nanoestructuras, esta disposición podría generar un fenómeno de polarización de la luz creando los contrastes de colores observados en las especies y afectando la reflectancia de ciertos rangos [43], [78]. Debemos indicar que en este trabajo no se investigó el efecto de la polarización de la luz en las estructuras estudiadas. Es decir, se estudia de forma promediada sobre todos los ángulos de polarización posibles en nuestros resultados. Esta variable física puede tener una gran importancia en la respuesta final observada de estas y por esta razón, se debería incluir en estudios posteriores.

En los análisis que siguen, a pesar de que las nanoestructuras se “clasifican” en cuatro tipos, existen diferencias importantes respecto de tamaños y medidas de ciertas partes como la altura de las crestas, longitud e inclinación de las laminillas y tamaño de las ventanas dentro de un mismo tipo, por lo que es complejo determinar si una sola clasificación tiene relación directa con un rango de luz. Sin embargo, en las especies de sotobosque, las cuales presentan mayor absorción en el rango visible que las de estrato medio y dosel, las nanoestructuras tienen menor cantidad de espacios vacíos y mayor prominencia de crestas y laminillas.

Adicionalmente, algunos estudios han estimado de manera cualitativa (en base a procesos de melanización) que la zona basal de las alas tanto anteriores como posteriores tienen una mayor influencia en los procesos de termorregulación que el resto del ala [79], aunque en menor medida en especies de tamaño pequeño [61]. Desde el análisis nanoestructural, en las especies analizadas, también se observa que las zonas basales muestran una arquitectura distinta que el resto de escamas que forman la

cobertura multicapa de las alas, las cuales en general tienen picos de reflectancia más bajos para todos los rangos del espectro que las zonas apical, marginal y discal. En este sentido, al igual que con la pigmentación, se requiere un estudio más detallado de las nanoestructuras de las escamas que conforman la zonal basal ya que sería la que tiene mayor relevancia en términos de intercambio de calor. En términos ecológicos, se ha asociado mayor reflectancia NIR del tórax y la zonal basal de las alas con climas tropicales relacionados a latitudes más bajas, es decir, una reflectancia NIR más alta en climas tropicales más cálidos y una reflectancia NIR más baja en climas más fríos [19]. El fenómeno de la iridiscencia también es más común en climas más cálidos [37].

Las alas sirven además como sensores de temperatura, no solo por la composición química la cual es mucho más variable (entre especies e individuos) que la configuración física, propiedad que influye directamente en el comportamiento de cada organismo [40], por tanto, las estructuras podrían no solo emplearse para captar energía sino solo para detectarla ya que cumplen con funciones biológicas debido a los fotorreceptores sensibles a los rangos desde el UV hasta el rojo que se han analizado en otros estudios [78], además, no se han analizado las nanoestructuras que forman la parte ventral de las alas que también podrían tener su propia función térmica.

No cabe duda que estructuras físicas de las alas están diseñadas para mejorar el desempeño biológico de las especies, ya sea por procesos de termorregulación [79] o por respuestas ópticas, como la iridiscencia, que influyen en el éxito de la supervivencia [80], pero esta respuesta depende no solo de la configuración morfológica asociada a la clasificación de los “tipos” de nanoestructura, sino también a la rugosidad, grosor de la cutícula y porosidad [37], además de la cantidad de aire inmerso entre la arquitectura de las escamas [80].

Como se sabe, la temperatura de un sistema depende de la energía total absorbida, la cual depende de la propia energía radiativa que penetra en el material y de la capacidad para absorberla, así como de la energía transportada por el propio material. Previamente, se ha confirmado que las alas de mariposas están mayoritariamente conformadas por quitina, al igual que la mayoría de insectos [62], sin embargo, dentro de la investigación bibliográfica de este trabajo, no se ha podido encontrar la confirmación del porcentaje de cada una de las 3 moléculas polimórficas de la quitina que forman las escamas. La quitina- α y - β se han estudiado ampliamente para determinar sus propiedades mecánicas, mientras que para la quitina- γ no se ha hecho lo propio [75] y, parecería ser un compuesto importante en la formación de las alas, independientemente del estrado de vuelo.

Finalmente, la respuesta de las alas a los rangos NIR, visible y UV abre las puertas para un sin número de aplicaciones biomiméticas. Varios autores han propuesto el desarrollo de sistemas fotónicos a modo de cristales de banda prohibida en dispositivos ópticos para corrección de longitudes de onda y semiconductores [25], pero también podrían considerarse aplicaciones térmicas para almacenamiento o dispersión de energía. Una de las aplicaciones más importantes de estas propiedades podría estar ligada al desarrollo de celdas solares que permitan optimizar y aumentar la baja tasa de absorción de la energía solar, permitiendo que la implementación de sistemas de captación de radiación sea más eficaz y por tanto más aplicable. Así mismo, la nanoarquitectura dentro de las escamas presentes en las alas podría evaluarse con más detenimiento como un sistema que permite disipar el calor sin necesidad de ninguna fuente de energía adicional, es decir, un sistema de enfriamiento que puede ser replicado para acondicionar diferentes estructuras civiles (ventanales, por ejemplo) o productos que requieren disipación de calor constante. Además, debido a su configuración anisotrópica, la mojabilidad es una propiedad que podría emplearse para estructuras autolimpiables o sistemas mecánicos ultra ligeros que soporten cargas específicas en una dirección.

A pesar de que el desarrollo de nanomateriales como réplica de estructuras biológicas sigue siendo un reto en la actualidad, sobre todo por la limitada capacidad tecnológica de controlar el diseño de patrones a nano y microescala [9], la caracterización sigue siendo un paso fundamental para crear sistemas más eficientes e innovadores.

4. CONCLUSIONES

Los resultados espectroscópicos de reflectancia difusa para los rangos NIR, visible y UV muestran diferencias entre las respuestas de las especies de estrado medio y dosel respecto de las de sotobosque, lo cual estaría relacionado a la configuración de las nanoestructuras. Esto se ajusta a varias hipótesis para ciertas especies de mariposas en las que el color físico tiene algún tipo de rol en la absorción de energía para procesos de termorregulación y respuestas ópticas con fines biológicos, lo cual además se relaciona con las características del medio circundante. No se ha podido determinar con exactitud qué arquitectura es la más eficiente para absorción de ciertos rangos del espectro electromagnético ya que las alas muestran varios tipos de nanoestructuras de manera simultánea, lo que sugiere un comportamiento complejo y sinérgico incluso con la coloración química.

De la revisión realizada, este trabajo es el primer estudio que reporta un análisis de nanoestructuras de alas de mariposas de una misma familia de acuerdo a la

estratificación de vuelo dentro de un mismo bosque, por lo que es un aporte relevante para futuros estudios con potenciales aplicaciones basadas en los principios de eficiencia y optimización energética que presentan las nanoestructuras. Sin embargo, definitivamente es necesario analizar más muestras de cada especie y quizás ampliar a más especies de la misma familia de las mariposas seleccionadas.

Referencias Bibliográficas

- [1] M. Ashby, H. Shercliff, and D. Cebon, *Materials: engineering, science, processing and design.*, 4th ed., vol. I. Butterworth-Heinemann, 2019.
- [2] P. di Sia, “Fourth Industrial Revolution (4IR) and Functionalized MNPs,” in *Analytical Applications of Functionalized Magnetic Nanoparticles*, The Royal Society of Chemistry, 2021, pp. 489–503.
- [3] Y. Fang, G. Sun, Y. Bi, and H. Zhi, “Multiple-dimensional micro/nano structural models for hydrophobicity of butterfly wing surfaces and coupling mechanism,” *Science Bulletin*, vol. 60, no. 2, pp. 256–263, 2015, doi: 10.1007/s11434-014-0653-3.
- [4] S. Niu *et al.*, “Excellent structure-based multifunction of morphe butterfly wings: A review,” *Journal of Bionic Engineering*, vol. 12, no. 2, pp. 170–189, 2015, doi: 10.1016/S1672-6529(14)60111-6.
- [5] L. P. Biró *et al.*, “Role of photonic-crystal-type structures in the thermal regulation of a Lycaenid butterfly sister species pair,” *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, vol. 67, no. 2, p. 7, 2003, doi: 10.1103/PhysRevE.67.021907.
- [6] S. Mena, K. M. Kozak, R. E. Cárdenas, and M. F. Checa, “Forest stratification shapes allometry and flight morphology of tropical butterflies,” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 287, no. 1937, p. 20201071, 2020, doi: 10.1098/rspb.2020.1071.
- [7] X. Luo, “Engineering Optics 2.0: A Revolution in Optical Materials, Devices, and Systems,” *ACS Photonics*, vol. 5, no. 12, pp. 4724–4738, Dec. 2018, doi: 10.1021/acsp Photonics.8b01036.
- [8] P. Kirya *et al.*, “Biomimicry of Blue Morpho butterfly wings: An introduction to nanotechnology through an interdisciplinary science education module,” *J Soc Inf Disp*, vol. 29, no. 11, pp. 896–915, Nov. 2021, doi: 10.1002/jsid.1071.
- [9] A. Jullien, M. Neradovskiy, A. Scarangella, and M. Mitov, “Biomimicry of iridescent, patterned insect cuticles: Comparison of biological and synthetic, cholesteric microcells using hyperspectral imaging,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 17, no. 167, Jun. 2020, doi: 10.1098/rsif.2020.0239.
- [10] M. Chaurasia and S. Srivastava, “BIOMIMICRY AND ITS APPLICATIONS-A REVIEW,” 2020. [Online]. Available: <http://www.ijeast.com>
- [11] Z. Q. Zhang, “Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness,” *Zootaxa*, vol. 3148, no. 1, pp. 7–12, 2011.
- [12] S. Clusella-Trullas and M. Nielsen, “The evolution of insect body coloration under changing climates,” *Current Opinion in Insect Science*, vol. 41, pp. 25–32, 2020, doi: 10.1016/j.cois.2020.05.007.
- [13] M. F. Checa, A. Barragán, J. Rodríguez, and M. Christman, “Temporal abundance patterns of butterfly communities (Lepidoptera: Nymphalidae) in the Ecuadorian Amazonia and their relationship with climate,” *Annales de la Société Entomologique de France*, vol. 45, no. 4, pp. 470–486, 2009, doi: 10.1080/00379271.2009.10697630.

- [14] A. Haché and G. G. Allogho, "Opto-thermal modulation in biological photonic crystals," *Optics Communications*, vol. 284, no. 6, pp. 1656–1660, 2011, doi: 10.1016/j.optcom.2010.11.043.
- [15] J. Brashears, A. Aiello, and B. M. Seymoure, "Cool Bands: Wing bands decrease rate of heating, but not equilibrium temperature in *Anartia fatima*," *Journal of Thermal Biology*, vol. 56, pp. 100–108, 2016, doi: 10.1016/j.jtherbio.2016.01.007.
- [16] B. R. Scheffers, B. L. Phillips, W. F. Laurance, N. S. Sodhi, A. Diesmos, and S. E. Williams, "Increasing arboreality with altitude: A novel biogeographic dimension," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 280, no. 1770, pp. 1–9, 2013, doi: 10.1098/rspb.2013.1581.
- [17] M. Begon, C. Townsend, and J. Harper, *Ecology: from individuals to ecosystem*, 4th edn. M. 2006.
- [18] Pieter De Frenne *et al.*, "Latitudinal gradients as natural laboratories to infer species' responses to temperature," *Journal of Ecology*, vol. 101, pp. 784–795, 2013.
- [19] I. Kleckova, M. Konvicka, and J. Klecka, "Thermoregulation and microhabitat use in mountain butterflies of the genus *Erebia*: Importance of fine-scale habitat heterogeneity," *Journal of Thermal Biology*, vol. 41, no. 1, pp. 50–58, 2014, doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.02.002.
- [20] T. C. Bonebrake, C. L. Boggs, J. A. Stamberger, C. A. Deutsch, and P. R. Ehrlich, "From global change to a butterfly flapping: Biophysics and behaviour affect tropical climate change impacts," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 281, no. 1793, 2014, doi: 10.1098/rspb.2014.1264.
- [21] H. J. MacLean, J. K. Higgins, L. B. Buckley, and J. G. Kingsolver, "Morphological and physiological determinants of local adaptation to climate in Rocky Mountain butterflies," *Conservation Physiology*, vol. 4, no. 1, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1093/conphys/cow035.
- [22] G. Nève and C. Hall, "Variation of thorax flight temperature among twenty Australian butterflies (Lepidoptera: Papilionidae, Nymphalidae, Pieridae, Hesperidae, Lycaenidae)," *European Journal of Entomology*, vol. 113, pp. 571–578, 2016, doi: 10.14411/eje.2016.077.
- [23] M. Barton, W. Porter, and M. Kearney, "Behavioural thermoregulation and the relative roles of convection and radiation in a basking butterfly," *Journal of Thermal Biology*, vol. 41, no. 1, pp. 65–71, 2014, doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.02.004.
- [24] A. E. Kammer and J. Bracchi, "Role of the wings in the absorption of radiant energy by a butterfly," *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, vol. 45, no. 4, pp. 1057–1063, 1973, doi: 10.1016/0300-9629(73)90342-3.
- [25] W. Cheng, S. Xing, Y. Chen, R. Lin, T. C. Bonebrake, and A. Nakamura, "Dark butterflies camouflaged from predation in dark tropical forest understories," *Ecological Entomology*, vol. 43, no. 3, pp. 304–309, 2018, doi: 10.1111/een.12499.
- [26] B. D. Wilts, A. J. M. Vey, A. D. Briscoe, and D. G. Stavenga, "Longwing (*Heliconius*) butterflies combine a restricted set of pigmentary and structural

- coloration mechanisms," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1186/s12862-017-1073-1.
- [27] E. J. Warrant, "Animal Signals: Dirty Dancing in the Dark?," *Current Biology*, vol. 29, no. 17, pp. R834–R836, 2019, doi: 10.1016/j.cub.2019.07.046.
- [28] H. Fujiwara and H. Nishikawa, "Functional analysis of genes involved in color pattern formation in Lepidoptera," *Current Opinion in Insect Science*, vol. 17, pp. 16–23, 2016, doi: 10.1016/j.cois.2016.05.015.
- [29] E. Rosa and M. Saastamoinen, "Beyond thermal melanism: association of wing melanization with fitness and flight behaviour in a butterfly," *Animal Behaviour*, vol. 167, pp. 275–288, 2020, doi: 10.1016/j.anbehav.2020.07.015.
- [30] S. Clusella, J. H. van Wyk, and J. R. Spotila, "Thermal melanism in ectotherms," vol. 32, pp. 235–245, 2007, doi: 10.1016/j.jtherbio.2007.01.013.
- [31] J. M. Otaki, "Physiologically induced color-pattern changes in butterfly wings: Mechanistic and evolutionary implications," *Journal of Insect Physiology*, vol. 54, no. 7, pp. 1099–1112, 2008, doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.05.006.
- [32] A. L. Davis, H. F. Nijhout, and S. Johnsen, "Diverse nanostructures underlie thin ultra-black scales in butterflies," *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15033-1.
- [33] K. Kjærsmo *et al.*, "Iridescence as Camouflage," *Current Biology*, vol. 30, no. 3, pp. 551–555.e3, 2020, doi: 10.1016/j.cub.2019.12.013.
- [34] A. Masó, J. Romero, and J. Baixeras, "How many scales on the wings? A case study based on *Colias crocea* (Geoffroy, 1785) (Hexapoda: Lepidoptera, Pieridae)," *Arthropod Structure and Development*, vol. 57, 2020, doi: 10.1016/j.asd.2020.100947.
- [35] S. Chattopadhyay, Y. F. Huang, Y. J. Jen, A. Ganguly, K. H. Chen, and L. C. Chen, "Anti-reflecting and photonic nanostructures," *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 69, no. 1–3, pp. 1–35, 2010, doi: 10.1016/j.mser.2010.04.001.
- [36] Z. Han, S. Niu, L. Zhang, Z. Liu, and L. Ren, "Light Trapping Effect in Wing Scales of Butterfly *Papilio peranthus* and Its Simulations," *Journal of Bionic Engineering*, vol. 10, no. 2, pp. 162–169, 2013, doi: 10.1016/S1672-6529(13)60211-5.
- [37] A. Krishna, X. Nie, A. D. Warren, J. E. Llorente-Bousquets, A. D. Briscoe, and J. Lee, "Infrared optical and thermal properties of microstructures in butterfly wings," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 117, no. 3, pp. 1566–1572, 2020, doi: 10.1073/pnas.1906356117.
- [38] Z. Han *et al.*, "Excellent Color Sensitivity of Butterfly Wing Scales to Liquid Mediums," *Journal of Bionic Engineering*, vol. 13, no. 3, pp. 355–363, 2016, doi: 10.1016/S1672-6529(16)60308-6.
- [39] Y. Peng and A. K. Powell, "What do 3d-4f butterflies tell us?," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 426, p. 213490, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2020.213490.
- [40] C. Tsai *et al.*, "Physical and behavioral adaptations to prevent overheating of the living wings of butterflies," *Nature Communications*, vol. 11, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14408-8.

- [41] T. Chen *et al.*, “Microstructures of responsive photonic crystals on the stimuli-responsive performance: Effects and simulation,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 305, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1016/j.snb.2019.127421.
- [42] C. P. Barrera-Patiño *et al.*, “Photonic effects in natural nanostructures on *Morpho cypris* and *Greta oto* butterfly wings,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-62770-w.
- [43] G. Sun, Y. Fang, Q. Cong, and L. quan Ren, “Anisotropism of the Non-Smooth Surface of Butterfly Wing,” *Journal of Bionic Engineering*, vol. 6, no. 1, pp. 71–76, 2009, doi: 10.1016/S1672-6529(08)60094-3.
- [44] L. Wu, W. Ren, Y. Song, M. Xin, S. Niu, and Z. Han, “High light absorption properties and optical structures in butterfly *Heliophorus ila* Lvaenidae wing scales,” *RSC Advances*, vol. 5, no. 57, pp. 46011–46016, 2015, doi: 10.1039/c5ra04135j.
- [45] P. Vukusic and J. R. Sambles, “Shedding light on butterfly wings,” *Physics, Theory, and Applications of Periodic Structures in Optics*, vol. 4438, no. 0, p. 85, 2001, doi: 10.1117/12.451481.
- [46] D. J. Kemp and R. L. Rutowski, *The Role of Coloration in Mate Choice and Sexual Interactions in Butterflies*, 1st ed., vol. 43. Elsevier Inc., 2011. doi: 10.1016/B978-0-12-380896-7.00002-2.
- [47] D. Zhang *et al.*, “Inspiration from butterfly and moth wing scales: Characterization, modeling, and fabrication,” *Progress in Materials Science*, vol. 68, pp. 67–96, 2015, doi: 10.1016/j.pmatsci.2014.10.003.
- [48] S. R. Mouchet and P. Vukusic, “Structural Colours in Lepidopteran Scales,” *Advances in Insect Physiology*, vol. 54, pp. 1–53, 2018, doi: 10.1016/bs.aiip.2017.11.002.
- [49] D. G. Stavenga, H. L. Leertouwer, and K. Arikawa, “Coloration principles of the Great purple emperor butterfly (*Sasakia charonda*),” *Zoological Letters*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1186/s40851-020-00164-6.
- [50] H. Ghiradella, *Insect Cuticular Surface Modifications: Scales and Other Structural Formations*, 1st ed., vol. 38, no. C. Elsevier Ltd., 2010. doi: 10.1016/S0065-2806(10)38006-4.
- [51] M. A. Giraldo, S. Yoshioka, and D. G. Stavenga, “Far field scattering pattern of differently structured butterfly scales,” *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, vol. 194, no. 3, pp. 201–207, 2008, doi: 10.1007/s00359-007-0297-8.
- [52] N. I. Morehouse, P. Vukusic, and R. Rutowski, “Pterin pigment granules are responsible for both broadband light scattering and wavelength selective absorption in the wing scales of pierid butterflies,” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 274, no. 1608, pp. 359–366, 2007, doi: 10.1098/rspb.2006.3730.
- [53] B. Wijnen, H. L. Leertouwer, and D. G. Stavenga, “Colors and pterin pigmentation of pierid butterfly wings,” *Journal of Insect Physiology*, vol. 53, no. 12, pp. 1206–1217, 2007, doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.06.016.

- [54] S. Wickham, L. Poladian, M. C. J. Large, and P. Vukusic, "Control of iridescence in natural photonic structures: the case of butterfly scales," *Optical Biomimetics*, no. 1665, pp. 147–176e, 2012, doi: 10.1533/9780857097651.147.
- [55] P. Vukusic, "Chapter 12. Advanced Photonic Systems on the Wing-Scales of Lepidoptera," in *Functional Surfaces in Biology*, vol. 1, no. 1972, S. N. Gorb, Ed. Exeter, UK: Springer Science+Business Media B.V, 2009, pp. 1–384. doi: 10.1007/978-1-4020-6697-9.
- [56] S. Yoshioka and S. Kinoshita, "Wavelength-selective and anisotropic light-diffusing scale on the wing of the Morpho butterfly," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 271, no. 1539, pp. 581–587, 2004, doi: 10.1098/rspb.2003.2618.
- [57] D. Zhang *et al.*, "Inspiration from butterfly and moth wing scales: Characterization, modeling, and fabrication," *Progress in Materials Science*, vol. 68. Elsevier Ltd, pp. 67–96, 2015. doi: 10.1016/j.pmatsci.2014.10.003.
- [58] P. Vukusic, J. R. Sambles, and C. R. Lawrence, "Structurally assisted blackness in butterfly scales," *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 271, no. SUPPL. 4, pp. 237–239, 2004, doi: 10.1098/rsbl.2003.0150.
- [59] V. Saranathan *et al.*, "Structure, function, and self-assembly of single network gyroid (I4 132) photonic crystals in butterfly wing scales," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 26, pp. 11676–11681, 2010, doi: 10.1073/pnas.0909616107.
- [60] K. Kertész, Z. Bálint, G. Piszter, Z. E. Horváth, and L. P. Biró, "Multi-instrumental techniques for evaluating butterfly structural colors: A case study on *Polyommatus bellargus* (Rottemburg, 1775) (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatinae)," *Arthropod Structure & Development*, vol. 61, p. 101010, 2021, doi: 10.1016/j.asd.2020.101010.
- [61] R. de Keyser, C. J. Breuker, R. S. Hails, R. L. H. Dennis, and T. G. Shreeve, "Why small is beautiful: Wing colour is free from thermoregulatory constraint in the small lycaenid butterfly, *Polyommatus icarus*," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 4, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0122623.
- [62] M. Kaya *et al.*, "How Taxonomic Relations Affect the Physicochemical Properties of Chitin," *Food Biophysics*, vol. 11, no. 1, pp. 10–19, Mar. 2016, doi: 10.1007/s11483-015-9404-5.
- [63] J. Sackey, Z. Y. Nuru, S. Berthier, and M. Maaza, "Investigation of Nanostructures on the Crepuscular 'Eyespot' of the Caligo Memnon Nymphalidae Felder (1866) Butterfly," *Materials Today: Proceedings*, vol. 2, no. 7, pp. 4125–4135, 2015, doi: 10.1016/j.matpr.2015.08.043.
- [64] K. Kertész *et al.*, "Additive and subtractive modification of butterfly wing structural colors," *Colloids and Interface Science Communications*, vol. 40, 2021, doi: 10.1016/j.colcom.2020.100346.
- [65] J. M. Otaki, "The fractal geometry of the nymphalid groundplan: Self-similar configuration of color pattern symmetry systems in butterfly wings," *Insects*, vol. 12, no. 1, pp. 1–25, 2021, doi: 10.3390/insects12010039.
- [66] K. Kertész, Z. Bálint, G. Piszter, Z. E. Horváth, and L. P. Biró, "Multi-instrumental techniques for evaluating butterfly structural colors: A case study on *Polyommatus*

- bellargus (Rottemburg, 1775) (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatainae),” *Arthropod Structure & Development*, vol. 61, p. 101010, 2021, doi: 10.1016/j.asd.2020.101010.
- [67] B. de C. Vidal, “Butterfly scale form birefringence related to photonics,” *Micron*, vol. 42, no. 8, pp. 801–807, 2011, doi: 10.1016/j.micron.2011.04.006.
- [68] D. L. Maurer, T. Kohl, and M. J. Gebhardt, “Cuticular microstructures turn specular black into matt black in a stick insect,” *Arthropod Structure and Development*, vol. 46, no. 2, pp. 147–155, 2017, doi: 10.1016/j.asd.2016.11.006.
- [69] B. D. Wilts, H. L. Leertouwer, and D. G. Stavenga, “Imaging scatterometry and microspectrophotometry of lycaenid butterfly wing scales with perforated multilayers,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 6, no. SUPPL. 2, 2009, doi: 10.1098/rsif.2008.0299.focus.
- [70] R. O. Prum, T. Quinn, and R. H. Torres, “Anatomically diverse butterfly scales all produce structural colours by coherent scattering,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, no. 4, pp. 748–765, 2006, doi: 10.1242/jeb.02051.
- [71] R. Wagner, B. R. Pittendrigh, and A. Raman, “Local elasticity and adhesion of nanostructures on *Drosophila melanogaster* wing membrane studied using atomic force microscopy,” *Applied Surface Science*, vol. 259, pp. 225–230, 2012, doi: 10.1016/j.apsusc.2012.07.023.
- [72] N. Myers, R. A. Mittermeier², C. G. Mittermeier², G. A. B. da Fonseca³, and J. Kent, “Biodiversity hotspots for conservation priorities,” 2000. [Online]. Available: www.nature.com
- [73] A. R. Vega-Pérez, H. A. Banda-Gamboa, and C. Costa-Vera, “Design, test and implementation of a Multispectral-image Reconstruction System Based on a 2D Optical Scanner, a multiwavelength LED-based illuminator, and a compact spectrometer,” 2014.
- [74] H. Greven, M. Kaya, I. Sargin, T. Baran, R. Møbjerg Kristensen, and M. Vinther Sørensen, “Characterisation of chitin in the cuticle of a velvet worm (*Onychophora*),” *Turkish Journal of Zoology*, vol. 43, no. 5, pp. 416–424, 2019, doi: 10.3906/zoo-1903-37.
- [75] M. Kaya *et al.*, “On chemistry of γ -chitin,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 176, pp. 177–186, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.076.
- [76] H. Schmitz, “Thermal characterization of butterfly wings-1. Absorption in relation to different color, surface structure and basking type,” *Journal of Thermal Biology*, vol. 19, no. 6, pp. 403–412, 1994, doi: 10.1016/0306-4565(94)90039-6.
- [77] B. D. Wilts, B. Wijnen, H. L. Leertouwer, U. Steiner, and D. G. Stavenga, “Extreme Refractive Index Wing Scale Beads Containing Dense Pterin Pigments Cause the Bright Colors of Pierid Butterflies,” *Advanced Optical Materials*, vol. 5, no. 3, Feb. 2017, doi: 10.1002/adom.201600879.
- [78] B. D. Wilts, M. A. Giraldo, and D. G. Stavenga, “Unique wing scale photonics of male Rajah Brooke’s birdwing butterflies,” *Frontiers in Zoology*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1186/s12983-016-0168-7.

- [79] S. G. Bosi, J. Hayes, M. C. J. Large, and L. Poladian, "Color, iridescence, and thermoregulation in Lepidoptera," *Applied Optics*, vol. 47, no. 29, pp. 5235–5241, 2008, doi: 10.1364/AO.47.005235.
- [80] L. P. Biró *et al.*, "Living photonic crystals: Butterfly scales - Nanostructure and optical properties," *Materials Science and Engineering C*, vol. 27, no. 5-8 SPEC. ISS., pp. 941–946, 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.09.043.

ANEXOS