



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Área Académica de Biología

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y
CONSERVACIÓN**

TESIS

**Efectos del manganeso y aluminio en el comportamiento de
forrajeo y sobrevivencia de la mariposa *Leptophobia aripa***

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biodiversidad y Conservación

PRESENTA

Marcela Deni Valtierra Osorio

Director(a)

Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark

Mineral de la Reforma, Hgo., México.

Julio 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Biología

Department of Biology

Mineral de la Reforma, Hgo., a 08 de julio de 2025

Número de control: ICBI-AAB/614/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

MTRA.OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

El Comité Tutorial del nombre del producto que indique el documento curricular del programa educativo de posgrado titulado **“Efectos del manganeso y aluminio en el comportamiento de forrajeo y sobrevivencia de la mariposa Leptophobia aripa”**, realizado por la sustentante **Marcela Deni Valtierra Osorio** con número de cuenta **378272** perteneciente al programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

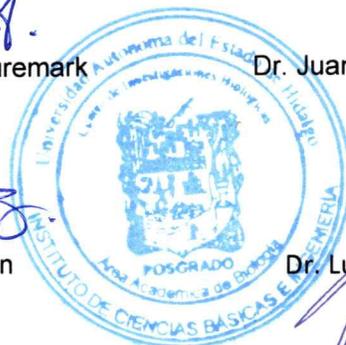
Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”

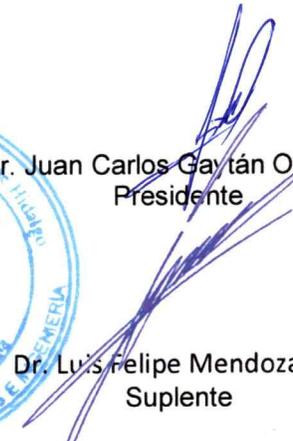
El Comité Tutorial


Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark
Vocal


Dr. Juan Carlos Gaytán Ovarzun
Presidente


Dra. Iriana Leticia Zuria Jordan
Secretario




Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca
Suplente

LFRP/DEGL

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40063, 40064 y 40065
aab_icbi@uaeh.edu.mx, maritzal@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”



2025



uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al comité tutorial que me acompañó durante este proceso. Al Dr. Ignacio E. Castellanos Sturemark, quien me brindó su confianza al aceptarme como su alumna y me orientó en cada paso; su experiencia, compromiso y empatía fueron imprescindibles para la realización de este trabajo. A la Dra. Iriana L. Zuria Jordán, quien me compartió consejos y observaciones fundamentales para culminar el trabajo. Al Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún, cuyas invaluable aportaciones enriquecieron este estudio. Y al Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca, quien me brindó comentarios constructivos y una valiosa guía a lo largo de esta investigación.

A mis padres, Juan Alberto Valtierra Pacheco y Teresa Alicia Osorio Reyes, infinitas gracias por ser mi base. Sin su apoyo inquebrantable en los momentos más complicados, no habría encontrado forma de seguir adelante. A mis hermanas, Jessica Yamile Valtierra Osorio y Natalia Leilani Valtierra Osorio, por su constante aliento y por ser parte de mis momentos de descanso y alegría. A mis abuelos, cuya fortaleza y dedicación sembraron las bases que me permitieron alcanzar este logro.

A mis incondicionales amigas, Claudia P. Blancas Díaz, Karen J. Bautista Zamora y Liliana Serrano Bracho, y a mi querido amigo Juan L. Gutiérrez Olvera, gracias por su cariño y apoyo incondicional. Su compañía fue clave en los días difíciles y aún más en los momentos de alegría. Cada uno, a su manera, hizo más llevadero este camino, y por eso les estaré siempre agradecida.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por el apoyo financiero (no. de CVU 1270852) brindado durante mis estudios de posgrado, sin el cual esta investigación no habría sido posible.

Al Posgrado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, UAEH, por brindarme un entorno académico de excelencia, que enriqueció mi formación y fortaleció el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. OBJETIVOS.....	20
V. HIPÓTESIS.....	21
VI. METODOLOGÍA.....	22
VII. RESULTADOS.....	34
VIII. DISCUSIÓN.....	45
IX. CONCLUSIÓN.....	55
X. LITERATURA CITADA.....	56

RESUMEN

La contaminación por metales en ambientes antropizados representa un riesgo significativo para los polinizadores, los cuales pueden estar expuestos a estos elementos a través de diversas vías, como el consumo de agua, néctar y polen contaminados. Dada la importancia ecológica de estos organismos y la limitada información disponible sobre los efectos de los metales en polinizadores distintos a las abejas, especialmente en mariposas, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el impacto del manganeso y el aluminio sobre la sobrevivencia y el comportamiento de forrajeo de adultos de la mariposa *Leptophobia aripa*.

Para ello, se expuso a individuos criados en cautiverio a diferentes concentraciones de los metales disueltos en sacarosa al 10%. Se utilizaron concentraciones de 0-1250 mg/L para el manganeso y de 0-950 mg/L para el aluminio, con el fin de determinar sus efectos en la sobrevivencia, la capacidad de las mariposas para detectar y rechazar metales en el alimento y su influencia en la constancia floral. Los resultados mostraron una relación negativa y significativa entre la concentración del metal y la sobrevivencia de los individuos. Durante la exposición inicial, las mariposas no mostraron evidencia de detección a la presencia de metales en el alimento, ya que el tiempo de alimentación no difirió entre concentraciones. Sin embargo, a partir del segundo día de exposición, se observó una disminución progresiva del tiempo de alimentación a lo largo de 7 días de exposición, siendo esta reducción más pronunciada a mayores concentraciones de los metales. Asimismo, se encontró que después de 24 horas de haber ingerido las soluciones más altas de manganeso, las mariposas redujeron significativamente su tiempo de alimentación al ser expuestas nuevamente a una solución de sacarosa, lo que sugiere un posible efecto condicionado. Este efecto no se observó en ninguna de las concentraciones de aluminio evaluadas. Por último, se encontró que ni el manganeso ni el aluminio, en ninguna de las concentraciones utilizadas, afectaron la constancia floral en *L. aripa*. Estos resultados aportan nueva evidencia sobre los efectos letales y subletales de la contaminación por metales en mariposas, y

contribuyen a ampliar el conocimiento existente, hasta ahora centrado principalmente en abejas.

I. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son elementos que presentan características de metales y una densidad mayor a 5 g cm^{-3} (Weast & Astle 1984). Estos elementos se encuentran de forma natural en el sustrato y pueden clasificarse en tres tipos, de acuerdo a sus efectos en los organismos: metales esenciales, no esenciales y tóxicos (Roane & Pepper, 2000; Lucho et al., 2005). Los metales esenciales (e.g., cobre, manganeso y zinc), son necesarios para el correcto funcionamiento fisiológico de los organismos, sin embargo, en concentraciones elevadas pueden volverse tóxicos. Por otro lado los metales no esenciales (e.g., aluminio, cadmio y plomo) no cumplen funciones fisiológicas conocidas y resultan tóxicos en grandes cantidades, mientras los metales tóxicos son aquellos que incluso en cantidades mínimas generan daño (Cornelis & Nordberg, 2007). Además de su presencia natural, la deposición de metales también se origina de diversas actividades humanas como la construcción, manejo inadecuado de basura, el vertido de aguas residuales sin tratamiento previo, el transporte, el uso de fertilizantes y pesticidas, la industria y la minería (Bradl, 2005; Tchounwou et al., 2012; Li et al., 2018), lo cual ha llevado a un incremento significativo de metales en las zonas con influencia humana en el planeta (Tchounwou et al., 2012; Li et al., 2018). A diferencia de otros contaminantes, los metales no se degradan, por lo que se acumulan en el ambiente y permanecen aún después de que las fuentes de contaminación han sido removidas (Raffa et al., 2021). En consecuencia, los metales son considerados como unos de los principales contaminantes ambientales actuales en el planeta y existe una gran preocupación por el efecto que estos pueden tener sobre la biodiversidad (Bradl, 2005; Bahadorani & Hilliker, 2009).

En los últimos años ha habido un creciente interés por estudiar el efecto de los metales sobre los polinizadores, particularmente los insectos, un grupo predominante en ambientes antropizados y de gran importancia para el bienestar humano, el mantenimiento de la diversidad y funcionalidad de los ecosistemas (Ben-Shahar, 2018). Este grupo de animales puede entrar en contacto con metales o metaloide de interés toxicológico (MMIT) al alimentarse del polen y néctar de plantas que están en contacto con suelos y cuerpos de agua contaminados con estos elementos (Di et al., 2016; Sivakoff & Gardiner, 2017), así como, durante su desplazamiento aéreo por contacto

con partículas en suspensión (Negri et al., 2015). La mayoría de los estudios realizados sobre el efecto de los metales en insectos polinizadores se han enfocado en las abejas y en algunos metales comunes en los suelos como el cadmio, cobre, plomo y zinc, por lo que es escasa la información que se tiene acerca de los efectos que pueden tener en este grupo de animales (Ali et al., 2019; Scott et al., 2023).

Un grupo de insectos polinizadores con una presencia importante en los ambientes antropizados es el de los lepidópteros (Pérez, 2017; Duran & Molina, 2020; Cañadas & Gortari, 2025). Se conoce poco sobre el efecto de metales en lepidópteros adultos ya que la mayoría de los estudios se han realizado en la etapa larvaria, cuando se alimentan de la parte vegetativa de las plantas hospederas, muchos estudios se han enfocado en especies de mariposas nocturnas de importancia económica (Scott et al., 2023). Por lo tanto, en este trabajo se estudió el efecto de dos metales poco investigados en insectos polinizadores, manganeso y aluminio, el primero esencial y el segundo no esencial para los insectos, en la sobrevivencia, comportamiento de alimentación y memoria de adultos de la mariposa diurna *Leptophobia aripa* (Boisduval, 1836) (Lepidoptera: Pieridae) basado en que la polinización psicófila, aquella realizada por lepidópteros diurnos como *L. aripa*, es importante para numerosas especies de plantas (Aguado Martin et al., 2015). Se eligió a *L. aripa* como organismo modelo debido a que es una especie de fácil crianza en condiciones controladas y presenta un ciclo de vida corto, lo que facilita un periodo de experimentación relativamente breve.

II. ANTECEDENTES

Generalidades de la especie

Leptophobia aripa es una mariposa con un ciclo de vida promedio de 28 días, sus huevos son de color amarillo, los cuales normalmente son colocados por la hembra en el envés de las hojas de sus plantas hospederas y eclosionan 5 días después de la puesta. Tienen cinco estadios larvales en los que presentan una coloración verde con ocelos negros y una banda longitudinal de color amarilla. Durante su estado larval se alimenta de plantas de la familia Brassicaceae (Lastra et al., 2006) y de otras especies dentro del orden Brassicales como *Tropaeolum majus* (Murillo & Giraldo, 2022). La pupa es de color verde con puntuaciones negras en la zona ventral y una línea media amarilla. El adulto se caracteriza por tener alas blancas (con color blanco amarilloso en los machos y blanco verdoso en las hembras), con una mancha negra en el borde de las alas anteriores y ojos de color verde (Bustillo & De Gutiérrez, 1975). La mariposa blanca de la col, como comúnmente se le denomina, es una especie que se cría con fines lucrativos (Fig. 1) (Sánchez, 2004).



Figura 1. *Leptophobia aripa* en su etapa de huevo, pupa y adulto (autoría propia).

Polinización por lepidópteros diurnos

Los lepidópteros cambian su alimentación de acuerdo con la etapa de su ciclo de vida. La mayoría de las especies de mariposas son exclusivamente herbívoras durante la etapa larvaria y en su etapa adulta, la alimentación se basa principalmente en néctar, sin embargo, agua y otros líquidos provenientes de frutos en descomposición o de origen animal pueden conformar parte de su dieta, en algunos casos también se alimentan de polen y un número reducido de especies no se alimenta durante la etapa adulta (Hainsworth et al., 2011; Willmer 2011). Para que las mariposas obtengan una cantidad significativa de néctar, se requiere de hasta una hora de alimentación (Hainsworth et al., 2011; Willmer 2011). La alimentación de los adultos se lleva a cabo por medio de la proboscis, estructura que en promedio en lepidópteros mide 17 mm (Willmer 2011).

La eficiencia en la polinización de las plantas por mariposas es aparentemente menor en comparación con la realizada por abejas debido a que los lepidópteros transportan el polen principalmente en la cabeza mientras que las abejas tienen estructuras especializadas para el transporte del polen (Levin & Berube 1972; Linhart & Mendenhall 1977; Murphy 1984; Pettersson 1991). A pesar de esto, la polinización psicófila, aquella realizada por lepidópteros como *L. aripa*, es importante para numerosas especies de plantas (Aguado Martín et al., 2015).

Existe una relación importante entre plantas y polinizadores que ha favorecido la biodiversidad de ambos grupos (Kay & Sargent, 2009): las plantas ofrecen néctar y los animales transportan el polen que puede llevar a la reproducción de la planta. La eficiencia de la polinización y consecuente formación de semillas se incrementa cuando los visitantes florales visitan la misma especie de planta (Willmer, 2011), lo cual ocurre cuando los polinizadores utilizan al mismo tiempo o en secuencia distintos sentidos para localizar los recursos (néctar y polen principalmente) de una misma especie de planta (Weiss, 2001).

Preferencia innata y constancia floral

La mayoría de los lepidópteros al momento de emerger de la crisálida necesitan alimentarse, por lo que identificar su alimento resulta vital. La elección del primer alimento de las mariposas en su etapa adulta se denomina preferencia innata (Knoll, 1922). *Leptophobia aripa* es una mariposa que muestra una clara preferencia innata por flores de color rojo en condiciones de laboratorio (Fig. 2). Cuando las flores artificiales son amarillas, verdes, azules, rosas, blancas y rojas, individuos sin experiencia de la “mariposa blanca de la col” eligieron significativamente más veces las flores rojas (Muñoz et al., 2021; Valtierra & Castellanos, 2021).

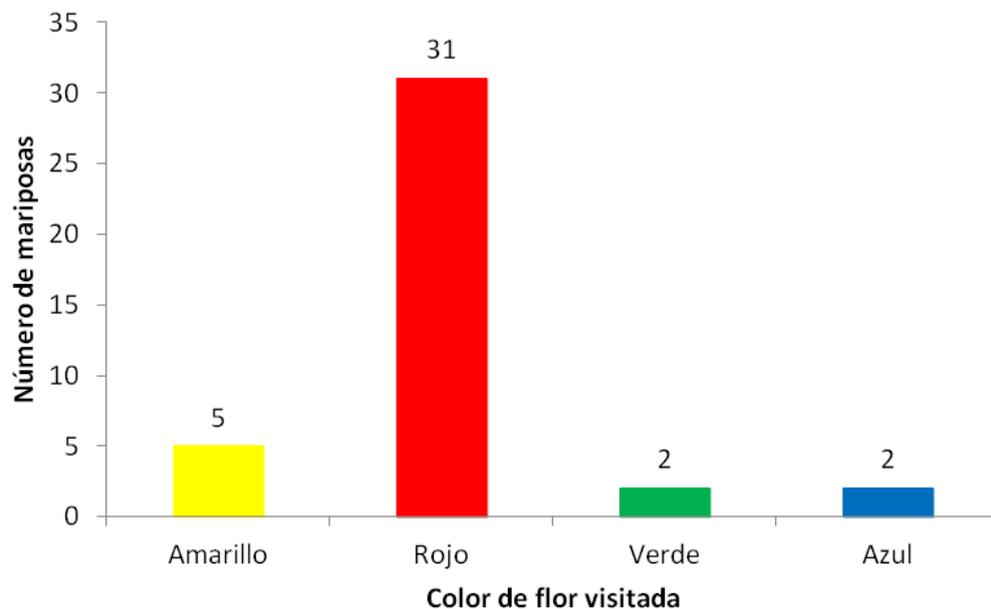


Figura 2. Elección innata de color en *Leptophobia aripa* empleando flores artificiales amarillas, rojas, verdes y azules (Valtierra & Castellanos, 2021).

Las mariposas, al igual que otros grupos de insectos que visitan las flores en busca de alimento, pueden aprender a relacionar algún rasgo específico de las flores de una especie o morfo de flor con una recompensa, a lo cual se le ha denominado constancia floral (Menzel et al., 1993). Esta capacidad de seleccionar las flores de acuerdo con lo aprendido le permite a un individuo optimizar su tiempo y energía al evitar flores con poco néctar o polen, lo que resulta útil en su vida adulta donde el tiempo para dispersarse y reproducirse es limitado (Goulson & Cory 1993).

No obstante, los insectos polinizadores están limitados por su capacidad de memoria para desarrollar una constancia floral a uno o más tipos de flores (Dawkins 1971; Pietrewicz & Kamil 1981; Stanton 1984; Waser 1986).

La constancia floral varía entre los individuos de la misma especie, incluso en organismos coloniales como las abejas debido a que depende intrínsecamente de la secuencia de flores con las que el individuo interactúa durante su forrajeo (Waser 1986).

Exposición a los metales en lepidópteros

Los lepidópteros son potencialmente capaces de alimentarse de cualquier parte de una planta en su estado larvario y como adultos generalmente se alimentan de néctar y ocasionalmente de polen. Por lo tanto, si una planta presenta metales en sus tejidos, los lepidópteros pueden exponerse a estos durante su alimentación (Meindl & Ashman 2013, 2014; Morón et al., 2014; Alengebawy et al., 2021). Las plantas pueden adquirir metales pesados si el agua, suelo o aire en el que crecen se encuentra contaminado (Kabata-Pendias, 2000; Hladun et al., 2013; Hladun et al., 2016). Una manera de responder de las plantas frente a los contaminantes es acumularlos en especial en regiones como tallos, hojas, raíces, néctar, polen y frutos. La capacidad de bioacumulación varía dependiendo del taxón, existen especies exclusoras que limitan la absorción o translocación de metales en tejidos aéreos. Las plantas acumuladoras absorben metales y los translocan en partes aéreas especialmente tallos y hojas. Las especies hiperacumuladoras son capaces de absorber y acumular metales sin presentar signos visibles de toxicidad en concentraciones 100 veces superiores que las plantas no hiperacumuladoras (Jaffre et al., 1976; Agnihotri & Seth 2019). Un gran porcentaje de las plantas hiperacumuladoras pertenece a la familia Brassicaceae, siendo *Brassica oleracea* un ejemplo (Al-Najar et al., 2005; Gall & Rajakaruna 2013; Nikolić & Tomašević 2020).

Los lepidópteros también pueden exponerse a metales al alimentarse de un medio líquido contaminado, por lo que, para el presente trabajo se considera

importante mencionar algunas de las fuentes de medios líquidos de donde pueden exponerse a metales pesados (Willmer 2011). En México los cuerpos de agua se contaminan con agentes tóxicos de origen antrópico como los metales pesados debido al vertido de aguas residuales sin tratamiento previo. El problema ha posicionado al país entre los primeros en el mundo con mayor uso de agua sin tratar (Jiménez & Asano, 2008; CONAGUA, 2015; Castro- González et al., 2019). Los metales pesados en los cuerpos de agua y campos agrícolas representan un problema toxicológico para la salud (Mancilla et al., 2012).

Efectos generales de los metales en invertebrados

El efecto de los metales que más se ha estudiado en invertebrados, es el letal, donde determinada dosis/concentración del elemento genera la muerte de los organismos a través de un daño sistémico. Se ha observado que los efectos se pueden ver potenciados en una etapa vulnerable como la larval, o en adultos donde puede variar en sus efectos debido al género (masculino/femenino), estado nutricional, salud y tamaño del individuo (Bayley et al., 1995). Los efectos letales varían dependiendo del metal, e incluso si la especie de animal es especialista o generalista (Boyd et al., 2002). Los estudios se basan en exponer a los animales a una única dosis (exposición aguda) o varias dosis (exposición crónica) (Hladun et al., 2012).

Los metales también pueden provocar efectos subletales modificando el comportamiento de los individuos en actividades como la alimentación, reproducción y respuesta inmunológica (Reinecke & Reinecke 1997; Irving et al., 2003; Grześ 2010). Para el caso de la conducta de alimentación, se ha estudiado que algunos organismos pueden detectar los metales en el medio ambiente y evitarlos, sin embargo, existe la posibilidad de que algunos de estos elementos no puedan ser detectados y por lo tanto evitar su contacto e incluso consumo (Mogren & Tumblr 2010). Cuando los organismos se exponen al contaminante y generan efectos negativos, las consecuencias llegan a escalar al resto de las interacciones en las que estos participan en el ecosistema (Fisher 1998).

Detección de metales por insectos herbívoros

Dado que una de las principales vías de exposición a metales en insectos es a través de la alimentación (Meindl & Ashman 2013), es necesario determinar si estos organismos son capaces de detectarlos en el alimento y generar conductas medibles y/o identificables para evitarlos. Los insectos han desarrollado mecanismos fisiológicos que les permiten evitar consumir alimentos tóxicos, operando en dos niveles: uno que actúa antes de la ingestión del alimento y otro que opera después (Glendinning, 2002; Schoonhoven et al., 2005). En la fase pre-ingestiva, los compuestos potencialmente nocivos son detectados por células gustativas que responden de forma selectiva, permitiendo identificar y rechazar alimentos contaminados antes de su consumo (Chapman, 2003). En la fase post-ingestiva, el control del consumo puede estar mediado por una combinación de mecanismos fisiológicos, histológicos y conductuales. Estos incluyen efectos adversos sobre el aparato digestivo, malestares fisiológicos que conducen a la supresión de la alimentación, o asociaciones aprendidas entre la ingestión del compuesto y sus efectos negativos (Després et al., 2007). Además, los insectos cuentan con sistemas de desintoxicación que les permiten catabolizar compuestos tóxicos antes de que sean absorbidos a nivel sistémico y eliminarlos, lo que evita la activación innecesaria de respuestas aversivas frente a sustancias que son desagradables al gusto, lo cual disminuye la aparición de un riesgo letal (Li et al., 2007).

Los trabajos que han evaluado la capacidad que tienen los insectos herbívoros para detectar compuestos potencialmente tóxicos en el alimento antes de ingerirlos, frecuentemente han utilizado el reflejo de la extensión de la proboscis, el tiempo durante el cual se alimentan y la elección entre alimentos con compuestos químicos y alimentos control, como indicadores de respuestas de rechazo o aceptación. Por ejemplo, Monchanin et al (2022) demostraron que soluciones con concentraciones elevadas de plomo y zinc no inducen la extensión de la proboscis en adultos de la abeja *Apis mellifera*, mientras que soluciones con concentraciones

intermedias de los metales sí la inducen, pero el consumo disminuye, en comparación con abejas expuestas a soluciones control de sacarosa; en cambio, para el arsénico, los autores encontraron que las abejas sí extienden su proboscis e ingieren soluciones con altas concentraciones de este metal, sugiriendo que el arsénico no puede ser detectado por las abejas.

Para el caso de los lepidópteros, se ha documentado que el consumo de alimento por larvas de las polillas *Ostrinia nubilalis* (Crambidae) y *Heliothis virescens* (Noctuidae) es significativamente menor cuando se exponen por primera vez a una dieta con zinc en comparación con una dieta control sin el metal (Sell & Bodznick 1971; Gahukar 1975). También se ha documentado que las larvas de algunos lepidópteros pueden elegir entre alimentos con metales y alimentos control sin metal. Por ejemplo, las larvas de dos especies de mariposas del género *Pieris* (Pieridae) se alimentan significativamente menos de hojas con zinc que de hojas sin metal cuando se les ofrecen las dos opciones (Pollard & Baker 1997; Kazemi-Dinan et al. 2014). De manera similar, las orugas de la mariposa *Pieris rapae* (Pieridae) prefieren alimentarse de hojas sin níquel que de hojas con el metal (Martens and Boyd 1994) y las orugas de la polilla *Spodoptera exigua* (Noctuidae) prefieren dietas sin selenio que con el metal (Vickerman & Trumble 1999).

Los trabajos en los que se ha investigado la detección de metales en lepidópteros adultos han estudiado si los metales pueden influir en la oviposición de las hembras, lo cual afectaría el alimento al que sus crías estarían expuestas al emerger de los huevos. Uno de estos estudios es el de Vickerman et al., (2002), quienes encontraron que las hembras de la polilla *Spodoptera exigua* (Noctuidae) eligen ovipositar en las hojas de plantas sin selenio que en las hojas de plantas con el metal. Los autores también reportaron que las larvas que se alimentan de hojas con selenio presentaron una menor sobrevivencia que aquellas que se alimentaron de hojas control (Vickerman et al., 2002).

No se encontraron trabajos publicados que reporten si los lepidópteros adultos pueden detectar metales en su alimento en la etapa pre-ingestiva, pero sí para otros compuestos tóxicos. Por ejemplo, López et al. (2010) evaluaron la

capacidad que tienen los adultos de la polilla *Helicoverpa zea* (Noctuidae) para detectar un insecticida. Los autores encontraron que las polillas extienden su proboscis y la mantienen dentro de soluciones de sacarosa con bajas concentraciones de benzoato de emamectina, pero no presentan estos comportamientos cuando son expuestas a soluciones de sacarosa con altas concentraciones del insecticida (López et al., 2010).

Para evaluar si los insectos herbívoros pueden detectar y evitar compuestos químicos potencialmente tóxicos después de su ingestión, se han identificado dos patrones de comportamiento que pueden manifestarse después de la ausencia de una señal de rechazo inmediata. El primero consiste en un rechazo explícito del alimento que contiene el compuesto, y el segundo en una disminución del interés por un alimento normalmente apetecible tras la exposición previa al tóxico (Bernays & Chapman, 1994; Glendinning 2002).

Por ejemplo, el insecto herbívoro *Schistocerca gregaria* consume cantidades similares de alimento al exponerse por primera vez a dietas que contienen zinc y a dietas control sin el metal. Sin embargo, después de 4 horas, los individuos reducen el consumo de alimento con zinc en comparación con el alimento sin el metal (Behemer et al., 2005). Los autores atribuyeron la reducción en el consumo del alimento con zinc a una retroalimentación directa a los receptores gustativos, posiblemente mediada por la hemolinfa o a una asociación aprendida entre alguna característica del alimento y algún malestar (Behemer et al., 2005).

En el caso particular de los insectos polinizadores, Di et al. (2016) demostraron que, tras consumir soluciones de sacarosa con altas concentraciones de cadmio, cobre y plomo, las abejas adultas de *A. mellifera* mostraron un menor interés por soluciones de sacarosa sin metales, en comparación con abejas previamente alimentadas con soluciones control de sacarosa. Los autores propusieron dos posibles explicaciones para este comportamiento: 1) una adaptación conductual que permitiría a las abejas evitar alimentos contaminados, o 2) una respuesta de rechazo derivada de un estado fisiológico de malestar inducido por la exposición a los metales (Di et al., 2022). De manera similar, Hladun et al.

(2012) encontraron que abejas adultas de *A. mellifera* expuestas a soluciones de sacarosa con selenio también redujeron su consumo de soluciones de sacarosa sin el metal, en comparación con abejas alimentadas únicamente con sacarosa. Este cambio conductual fue interpretado como una respuesta adversa en las abejas, que podría tener consecuencias negativas a nivel de la colonia, ya que un rechazo persistente a la sacarosa puede traducirse en una menor actividad de forrajeo y, en consecuencia, en una menor recolección de néctar (Hladun et al., 2012).

No se encontraron trabajos publicados que reporten efectos post-ingestivos causados por metales en lepidópteros, pero sí para otros compuestos tóxicos. Uno de estos estudios es el de Messchendorp et al. (2000), quienes encontraron que larvas de la mariposa *Pieris brassicae* (Pieridae) consumen cantidades similares de alimento al exponerse por primera vez a hojas que contienen confertifolina, un metabolito secundario encontrado en algunas especies de plantas, y a hojas sin el compuesto, pero después de 1 hora de exposición, las larvas expuestas a la confertifolina presentaron una inhibición en los comportamientos de alimentación y locomoción en comparación con aquellas expuestas al alimento control. Los autores explicaron que el efecto inhibitorio retardado que se manifiesta al alimento con la confertifolina podría deberse a efectos tóxicos post-ingestivos o sensoriales producido por el compuesto (Messchendorp et al., 2000).

Justificación de la utilización del manganeso y aluminio

El manganeso es un metal que ocurre naturalmente en muchos tipos de rocas y suelos en el planeta, pero también es liberado al ambiente a través de diversas actividades humanas como las emisiones industriales, quema de combustibles fósiles y aplicación de pesticidas y fertilizantes (ATSDR, 2012). Este metal no está disponible de forma pura en el ambiente, se presenta combinado con otros elementos como el oxígeno, azufre o cloro. Puede estar presente en el aire, suelo y agua y puede ser absorbido por las raíces de las plantas que crecen en suelos contaminados con el metal y estar presente en diferentes tejidos de las plantas como el polen y néctar (ATSDR, 2012). El manganeso es un metal que está

presente en adultos de *L. aripa*, en adultos de la abeja *A. mellifera* (Hernández-Medina et al., 2025) y en los suelos de la zona metropolitana de Pachuca, Hidalgo (Pérez-Segovia, 2018), la cual es la localidad en la que se colectaron los organismos con los que se realizó esta tesis.

El manganeso es un metal esencial para los insectos y otros animales debido a su papel como cofactor y regulador de un gran número de enzimas (Crossgrove & Zheng, 2004; Pankau & Cooper, 2022); sin embargo, en concentraciones elevadas, es tóxico para vertebrados e invertebrados (Crossgrove & Zheng, 2004; Pankau & Cooper, 2022), por lo que la sobreexposición al manganeso es una preocupación toxicológica (ATSDR, 2012).

En poblaciones humanas expuestas a altas concentraciones de manganeso se ha visto que los individuos presentan una menor capacidad cognitiva (Santos-Burgoa et al., 2001), deterioro de la memoria (Al-Lozi et al., 2017) y comportamiento hostil (Rodrigues et al. 2018). A nivel fisiológico, la exposición al manganeso reduce los niveles de dopamina en diversas regiones del cerebro en algunos primates (Bird et al., 1984) y en ratas altera la homeostasis (Fordahl et al., 2010) y la viabilidad celular de neuroblastomas (Candia-Puma & Ramírez-Choquehuanca, 2016). Además, el manganeso puede afectar negativamente el funcionamiento de algunos neurotransmisores en vertebrados (Takeda, 2003) e invertebrados como los insectos (Bonilla-Ramírez et al. 2011). En seres humanos se han documentado casos de exposiciones elevadas al manganeso que resultan en una disminución en la fertilidad y un aumento en anomalías fetales (ATSDR, 2012). En diferentes especies de ratas se ha demostrado que concentraciones elevadas de manganeso disminuyen la fertilidad y aumentan la mortalidad (ATSDR, 2012).

Existen pocos trabajos en los que se ha estudiado el efecto del manganeso en los insectos polinizadores ya que la mayoría se han enfocado en los metales comúnmente presentes en los suelos como el cadmio, cobre, plomo y zinc (Scott et al., 2023). Se ha documentado que la sobreexposición al manganeso causa

mortalidad en abejas adultas de *A. mellifera*, las cuales presentan concentraciones letales de 50% (LC₅₀) con exposiciones a 1294 mg/L de manganeso (Khooshe et al., 2023). También se ha visto que la sobreexposición al manganeso afecta negativamente el comportamiento de forrajeo de *A. mellifera* ya que deteriora el sistema hormonal de insulina generando que no puedan seleccionar las flores con la mejor calidad de néctar (Cashion et al., 1996; Kaptanoğlu et al., 2007; Søvik et al., 2015). El manganeso también puede generar efectos neurológicos negativos en *A. mellifera* debido a que se acumula en la región cerebral de las abejas adultas, lo cual lleva a que las abejas inicien su etapa recolectora de alimento en edades más tempranas disminuyendo la recolecta de alimento y afectando la salud de la colmena (Ben-Shahar et al., 2004; Søvik et al., 2015).

No se encontraron trabajos publicados en los que se haya alimentado a lepidópteros adultos con algún metal. Existen trabajos en los que se ha expuesto a larvas de lepidópteros a algunos metales con el objetivo de evaluar el efecto en los adultos que emergen de las larvas expuestas al metal, sin embargo, en este tipo de estudios no se han utilizado el manganeso y el aluminio. Uno de estos estudios es el de Yang et al. (2022), quienes alimentaron larvas de la polilla *Spodoptera litura* (Noctuidae) con dieta artificial y diferentes concentraciones de cobre y encontraron que, en las concentraciones más elevadas, la sobrevivencia de las larvas es menor y los individuos que emergen como adultos son de menor tamaño y presentan una menor fecundidad en comparación con larvas expuestas a una dieta sin el metal. En otro estudio se encontró que los adultos de la polilla *Spodoptera exigua* (Noctuidae) que emergen de larvas alimentadas con cadmio presentan cópulas de menor duración que aquellos que emergen de larvas alimentadas sin el metal (Su et al. 2021).

Se encontraron cuatro estudios en los que se ha evaluado el efecto del manganeso en larvas de lepidópteros. Uno de estos trabajos es el de Zeng et al., (2021), quienes encontraron que el manganeso en concentraciones de 0.40 mmol/g afecta la composición de especies y la actividad enzimática de la microbiota y disminuye el peso de las orugas de la polilla *Lymantria dispar* (Erebidae). Otro de los

estudios es el de Kula et al. (2014), quienes alimentaron larvas de la polilla *Lymantria dispar* (Erebidae) con hojas de la planta *Betula pendula* impregnadas con soluciones de 0, 0.5, 5 y 10 mg/ml de manganeso y encontraron que la mortalidad de las larvas, su tiempo de desarrollo a adulto y el consumo de alimento incrementan conforme aumenta la concentración del metal. En el tercer estudio Martinek et al. (2020) expusieron a larvas de la polilla *Cabera pusaria* (Geometridae) a hojas de *B. pendula* impregnadas con soluciones de 0.5, 5, y 10 mg/ml de manganeso y encontraron que conforme aumenta la concentración del metal, aumentó la mortalidad de las larvas y aquellas que sobreviven a la exposición del metal, consumen más alimento. En el cuarto estudio se expuso a orugas de la polilla *Antheraea assamensis* (Saturniidae) a diferentes concentraciones de manganeso (0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 mg/L) y se evaluó su efecto en el tiempo de desarrollo a adulto, peso corporal y la actividad de enzimas antioxidantes (Islam et al., 2019). Los autores no encontraron que el manganeso afecte el tiempo de desarrollo a adulto y peso corporal, pero a partir de concentraciones de 0.04 mg/L, la actividad enzimática disminuyó significativamente. (Islam et al., 2019).

El aluminio ocurre de manera natural en la corteza terrestre y es el metal más abundante en el planeta (ATSDR, 2008). Este metal también es liberado al ambiente a través de diversas actividades humanas como la minería, la producción de metales que contienen aluminio, la quema de carbón y la mala gestión de desechos sólidos y aguas residuales (ATSDR, 2008). El aluminio no está disponible de forma pura en el ambiente y se presenta combinado con otros elementos como el oxígeno, silicio y flúor y puede estar presente en el aire, suelo y agua (ATSDR, 2008). Es un metal que también puede ser absorbido por las raíces de las plantas y estar presente en diferentes tejidos de las plantas como el polen y néctar (Chicas-Mosier et al. 2019). El aluminio es un metal que está presente en adultos de la abeja *A. mellifera* (Hernández-Medina et al., 2025) y en los suelos de la zona metropolitana de Pachuca, Hidalgo (Pérez-Segovia, 2018), la cual es la localidad en la que se colectaron los organismos con los que se realizó esta tesis.

A diferencia del manganeso, el aluminio no es considerado un metal esencial para los animales (Chicas-Mosier et al., 2019) y la sobreexposición a este metal es una preocupación toxicológica debido a que puede afectar negativamente a vertebrados e invertebrados (ATSDR, 2008). La sobreexposición al aluminio en humanos genera problemas neurológicos como confusión debido a que llega a impedir la transmisión de la información en las células nerviosas (Wills & Savory, 1985; Macdonald et al., 1987; Ingerman et al., 2008). En algunas especies de ratas, el aluminio puede provocar problemas en el aprendizaje y la memoria, en el sistema inmunológico y en la adecuada formación de los huesos (ATSDR, 2008; Cao et al., 2016). En seres humanos también se han reportado daños pulmonares como consecuencia de inhalar partículas de aluminio (ATSDR, 2008).

Existen pocos trabajos en los que se ha estudiado el efecto del aluminio en los insectos polinizadores y la mayoría se han hecho con abejas (Scott et al., 2023). En la abeja *A. mellifera*, la sobreexposición al aluminio disminuye su sobrevivencia, observándose efectos letales desde dosis de 40 mg/L (Chicas-Mosier et al., 2019). El aluminio presente en el polen se puede acumular en abejorros de la especie *Bombus terrestris* que ingieren polen contaminado con el metal, lo cual reduce su peso (Meindl & Ashman 2013; Exley et al., 2015). El aluminio también afecta la actividad alimentaria de *A. mellifera* al no permitir que el sistema hormonal de insulina funcione correctamente generando que las abejas adultas no elijan el alimento de la mejor calidad (Cashion et al., 1996; Kaptanoğlu et al., 2007). Por último, se ha encontrado que el aluminio afecta negativamente la constancia floral en la abeja *A. mellifera* al generar que cambien su constancia floral a un color de flor que previamente eligieron debido a que este contenía una recompensa, en comparación con abejas expuestas a un tratamiento control sin el metal (Chicas-Mosier et al., 2017).

Se encontraron dos estudios en el que se evaluó el efecto del aluminio en lepidópteros. En uno de los estudios, los autores reportaron que la sobrevivencia, el tiempo de desarrollo a adulto y el peso de las larvas de la polilla *Bombyx mori* (Bombycidae) disminuyen conforme aumenta la concentración de aluminio

utilizando de 0 a 0.5 mg de aluminio por larva cuyo peso era entre 0.60 y 0.70 g (Liu et al. 2018). En el otro trabajo, Feng et al. (2021) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de aluminio (0–334 mg /L) sobre la citotoxicidad y expresión génica de las orugas de la polilla *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae). Los autores encontraron que altas concentraciones de aluminio provocan alargamiento celular, ruptura de la membrana celular, disminuyen la viabilidad celular, causan apoptosis, inhiben la expresión de la proteína asociada a la regulación de mTOR e inducen daño oxidativo intracelular (Feng et al. 2021). Para las mariposas diurnas, solamente se encontró un estudio que reportó que las larvas de la mariposa monarca, al consumir distintos metales, entre ellos el aluminio, retienen estos elementos, los cuales se detectan posteriormente en sus alas después de haber emergido como adultos, sin embargo, no se estudió el efecto que puede tener el metal en la mariposa (Reich et al., 2023).

Con respecto a la detección del manganeso y el aluminio por insectos polinizadores, se han realizado muy pocos trabajos. Para el manganeso se encontró un trabajo con orugas de la polilla *Cabrera pusuaria* (Geometridae), las cuales no parecen detectar el metal en concentraciones de hasta 3198 mg/ Kg debido a que el consumo no se redujo significativamente entre tratamientos, sin embargo, los autores no incluyeron un tratamiento control en su trabajo, y la mortalidad de las orugas fue muy elevada en los tratamientos con las mayores concentraciones del metal, reduciendo el poder estadístico de sus análisis (Martinek et al. 2020). En abejas se cuenta con un trabajo en el que se encontró que *A. mellifera* no detecta el manganeso en el alimento (Gómez-Sánchez & Castellanos, 2025). Para el aluminio se ha reportado que *A. mellifera*, *Bombus impatiens* y *B. terrestris* no lo detectan en el alimento (Meindl & Ashman 2013; Chicas-Mosier 2019, 2022). No se encontraron trabajos en los que se haya reportado si los lepidópteros pueden detectar el aluminio en el alimento.

III. JUSTIFICACIÓN

Los metales son elementos que forman parte natural del planeta, no obstante, sus concentraciones se han incrementado debido a actividades antrópicas como la minería, la industria, la agricultura y la urbanización. Estos metales pueden encontrarse en diferentes matrices ambientales, incluyendo el suelo, el agua y el aire. Se consideran contaminantes de gran preocupación debido a su persistencia, su capacidad de bioacumularse en los organismos y a su alto potencial toxicológico.

En ambientes contaminados, muchas especies vegetales absorben metales a través de sus raíces, lo que conduce a la acumulación de estos elementos en diversos tejidos, incluidos el néctar y el polen. Esta vía representa una fuente directa de exposición para animales que dependen de recursos florales, como los insectos polinizadores; a pesar de la relevancia ecológica y económica de estos organismos, aún es poco el conocimiento sobre los efectos fisiológicos y conductuales que los metales generan en ellos, así como sobre la capacidad para detectar y evitar dichos contaminantes.

El desconocimiento es mayor en el caso de los lepidópteros, grupo que incluye especies polinizadoras importantes pero que han sido poco estudiadas en comparación con abejas y abejorros, por lo que el presente trabajo se enfocó en evaluar los efectos del manganeso y aluminio sobre adultos de *L. aripa*, una mariposa diurna común en ambientes tropicales. Se expuso a los organismos a diferentes concentraciones de manganeso y aluminio para analizar su efecto en la sobrevivencia, el comportamiento alimentario y la constancia floral, con el objetivo de aportar conocimiento sobre los impactos potenciales de estos contaminantes en interacciones planta-polinizador.

IV. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de metales pesados (manganeso y aluminio) en la sobrevivencia y comportamiento de forrajeo de la mariposa *Leptophobia aripa* exponiendo a individuos adultos a diferentes concentraciones de los metales.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del manganeso y aluminio en la sobrevivencia en adultos de *L. aripa*.
2. Evaluar si *L. aripa* detecta el manganeso y aluminio en su alimento.
3. Evaluar el efecto del manganeso y aluminio en la constancia floral de *L. aripa*.

V. HIPÓTESIS

Se espera que al aumentar las concentraciones de manganeso y aluminio disminuya la sobrevivencia de la mariposa *L. aripa*.

Se espera que el comportamiento alimentario de *L. aripa* se modifique conforme aumenten las concentraciones de manganeso y aluminio.

Se espera que al aumentar las concentraciones de manganeso y aluminio se presente una pérdida de memoria del color de la flor con el que *L. aripa* adquiere una constancia floral.

VI. METODOLOGÍA

Área de estudio, colecta y crianza de mariposas

Se utilizaron individuos de la especie *Leptophobia aripa* criados en condiciones controladas. Para iniciar la crianza de los organismos utilizados en el objetivo 1 se colectaron con el permiso de colecta SEMARNAT SGPA/DGVS/05481/21, huevos y adultos de *L. aripa* en la zona metropolitana de Pachuca, Hidalgo, la cual se encuentra entre las coordenadas geográficas 19°50' y 20°10'N y los 98°41' y 98°57'O a 2,400–2,800 m.s.n.m. (INEGI, 2010). La temperatura media anual es de 16.1°C y su precipitación media es de 486.9 mm (INEGI, 2017). La vegetación nativa consiste de matorral xerófilo representada principalmente por diversas especies de cactáceas, magueyes y yucas, mientras que la vegetación introducida está constituida por especies exóticas como pirul (*Schinus molle*), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), pino (*Pinus* spp.), enebro (*Juniperus* spp.), fresno (*Fraxinus uhdei*), y diferentes especies de pastos (Carbó-Ramírez y Zuria, 2011). La zona metropolitana de Pachuca tiene una población de 557,093 habitantes y se encuentra dentro de las 5 áreas metropolitanas con el mayor crecimiento urbano de México (INEGI, 2015). La zona presenta diferentes metales en el suelo, incluyendo el aluminio y el manganeso como resultado de diferentes fuentes de contaminantes, incluyendo a la actividad minera (Menezes et al. 2010; Pérez-Segovia, 2018; López et al. 2019), Así mismo, se ha encontrado la presencia de aluminio y el manganeso en los tejidos de algunas plantas (Hernández-Acosta et al., 2019) e insectos polinizadores que habitan en la zona metropolitana de Pachuca (Hernández-Medina et al., 2025).

Los adultos colectados fueron introducidos dentro de jaulas de 30 x 30 x 30 cm con una de sus plantas hospederas (Fig. 3), *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) (mastuerzo), una esponja con agua y papel absorbente previamente sumergido en agua con sacarosa al 10% (Sigma-Aldrich S9378-500G) que actuó como su alimento. Posterior a 3-4 días de la colecta se colocaron a los adultos con la planta hospedera para la puesta de huevos, los cuales a lo largo de su desarrollo y durante

sus etapas larvarias se mantuvieron en macetas. Las plantas fueron regadas con agua purificada previamente analizada para conocer los niveles de metales que contienen y así evitar una posible exposición a los metales en su etapa larvaria.



Figura 3. Jaulas con *Tropaeolum majus* donde se realizó la crianza de *Leptophobia aripa*.

Para la crianza de los organismos utilizados en el objetivo 2 y 3 (detección de metales por *L. aripa* y efecto de los metales en la constancia floral), los individuos de *L. aripa* se colectaron en su etapa de huevo, obtenidos de una de sus plantas hospederas *Tropaeolum majus* de la que se alimentaron durante su etapa larvaria y posteriormente se trasladaron a un envase plástico de 30 x 30 x 30 cm cubierto con tela (tul), donde permanecieron hasta adultos. Tras emerger de la crisálida, se mantuvieron en ayuno durante un día completo antes de iniciar con el tratamiento de exposición.

Objetivo 1: Efecto de los metales en la sobrevivencia

Para analizar el efecto de los metales sobre la sobrevivencia de las mariposas adultas se criaron en total 360 mariposas, las cuales se dividieron en dos grupos de 180 individuos, uno para el manganeso (Mn) y el otro para el aluminio (Al). Los grupos se colocaron sobre dos mesas de laboratorio iluminadas con luz blanca artificial en un ciclo de 12 h, acomodado en 12 grupos (uno para cada

concentración del metal, ver debajo) de 15 individuos (Tabla 1), colocando cada mariposa en un recipiente de plástico transparente de 1 L cubierto con tela tul sujetada con una banda elástica. Se les identificó por medio de un marcaje en el recipiente que consistía en el número de individuo, día de eclosión y concentración de metal asignado.

Después de un día de eclosión, a cada adulto del grupo “Mn” se le asignó una concentración diferente de manganeso (0 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 80 mg/L, 160 mg/L, 320 mg/L, 640 mg/L, 500 mg/L, 650 mg/L, 800 mg/L, 950 mg/L, 1250 mg/L) (Sigma-Aldrich 328146-500G) en una solución de sacarosa al 10% (Sigma-Aldrich S9378-500G). A cada adulto del grupo “Al” se le asignó una concentración diferente de aluminio (0 mg/L, 15 mg/L, 30 mg/L, 60 mg/L, 120 mg/L, 240 mg/L, 480 mg/L, 350 mg/L, 500 mg/L, 650 mg/L, 800 mg/L, 950 mg/L) (Sigma-Aldrich 237051-5G) en una solución de sacarosa al 10% (Sigma-Aldrich S9378-500G). Las concentraciones de los metales que fueron utilizadas en los experimentos se encuentran dentro del rango de valores reportados para estos metales en el néctar (Ben-Shahar et al., 2004; Søvik et al., 2015; Chicas-Mosier et al., 2019).

Durante este segundo día se colocó en los recipientes de 1 L una flor artificial que consistió en una tapa de color rojo con una solución control de 6 ml de sacarosa al 10% y una concentración específica de metal para cada grupo (Fig. 4). Los individuos expuestos a las diferentes concentraciones se observaron durante 3 h después de la alimentación y posteriormente, cada 24 h, para registrar el porcentaje de sobrevivencia (Goulson & Cory 1993). Durante los días de observación se alimentaron con sacarosa al 10% para evitar decesos por inanición.

Tabla 1. Condiciones utilizadas para medir el efecto de los metales en la sobrevivencia en adultos de *Leptophobia aripa*

Factor	Condición
Temperatura	25° +/- 2
Fotoperiodo	12:12 hrs luz/oscuridad
Humedad relativa	44.5% +/- 5
Edad de mariposas de prueba	28 días
Número de individuos por tratamiento	15 (3 réplicas)
Número de concentraciones más el control	12
Individuos por envase	1
Alimentación	Agua destilada + sacarosa
Tiempo de exposición	1 día
Tiempo de observación	31 días
Variable de respuesta	Sobrevivencia

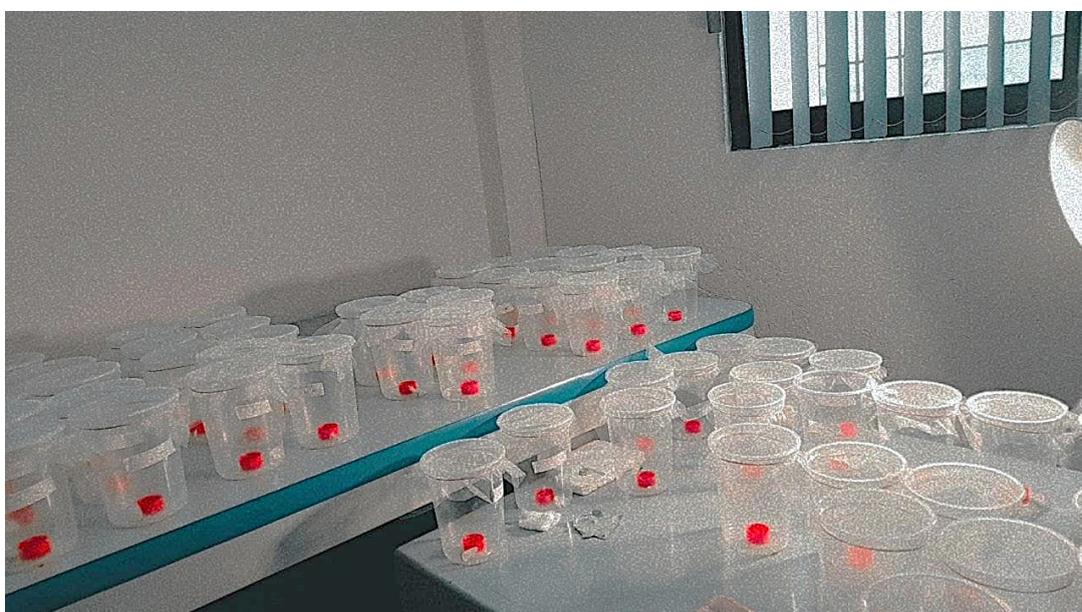


Figura 4. Mesas y recipientes donde se realizó el experimento en el que se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de manganeso y aluminio sobre la sobrevivencia de *Leptophobia aripa*.

Análisis estadísticos

Los efectos letales de diferentes contaminantes se evaluaron utilizando la tasa de sobrevivencia después de una exposición al contaminante (INE-SEMARNAT 2003; Kuperman et al., 2004; Arrieta & Luján, 2007). En el presente trabajo se utilizó un tiempo de 10 días después de la exposición a las concentraciones de manganeso y aluminio. Para cuantificar la sobrevivencia causada por cada concentración después de 10 días de la exposición, se realizaron análisis de

regresión lineal entre la concentración de cada metal y la sobrevivencia de *L. aripa* (Hammer et al., 2001; Kuperman et al., 2004).

Objetivo 2: Detección de metales por *Leptophobia aripa*

Se evaluó si los adultos de *L. aripa* detectan el manganeso y aluminio en su alimento antes de ingerirlos y después de haberlos ingerido. Para el primer caso se determinó si las mariposas que no habían sido expuestas a los metales: a) descienden en flores artificiales con soluciones de diferentes concentraciones de los metales, b) desenrollan su proboscis al exponerse a soluciones con diferentes concentraciones de los metales y c) difieren en el tiempo durante el cual se alimentan por primera vez de soluciones con diferentes concentraciones de los metales. Con las pruebas postingestión se evaluó si: a) las mariposas rechazan una solución de sacarosa después de 1 día de haber sido expuestos a los metales y b) el tiempo durante el cual se alimentan de soluciones con diferentes concentraciones de los metales difiere a lo largo de 7 días de exposición.

Previo a medir las respuestas de las mariposas a los metales, estas fueron alimentadas en flores amarillas, para así tener referencia de su comportamiento de alimentación antes de la exposición a los metales. Para alimentar a los grupos de individuos en las flores amarillas, a estas flores se les colocó agua destilada y sacarosa al 10%. Cada flor se construyó de una caja Petri tapada con tela tul (autoría propia) y tres círculos de papel de 3 cm de diámetro de color amarillo (Astrobrights Cardstock Color aid Corporation; Rodrigues & Weiss, 2012) colocados encima del tul para facilitar la alimentación (Fig. 5). Las soluciones se colocaron dentro de la caja Petri (Fig. 5).

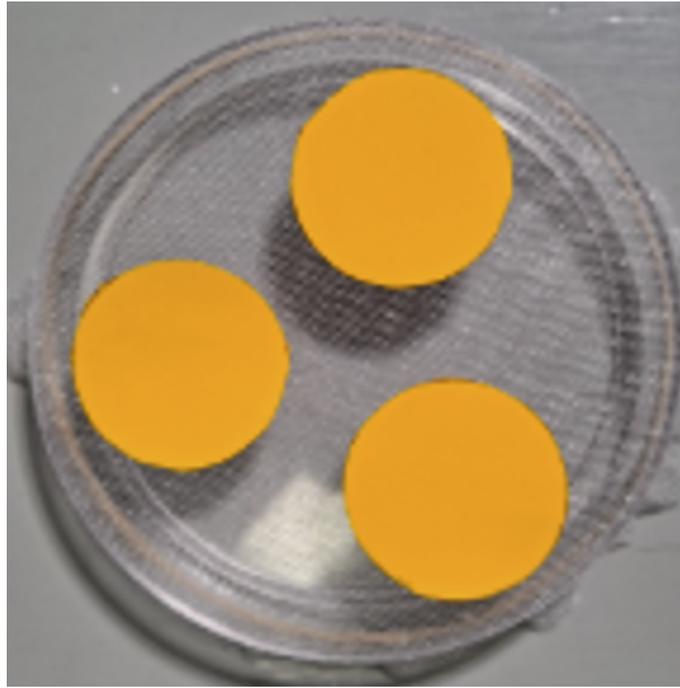


Figura 5. Flor artificial elaborada con cajas Petri, tela tul y círculos de color amarillo que simulan los pétalos (autoría propia).

Grupos de seis mariposas y 4 cajas Petri con flores artificiales de diferente color fueron introducidas dentro de jaulas de tul (Figs. 6 y 7) durante 2 h (11:00 a 13:00) iluminadas con lámparas de luz blanca 12:12 hrs luz/ oscuridad con una intensidad de 255 lúmenes (modelo SPOT PAR38 SL PROLIGHT 20W), este procedimiento se repitió durante 5 días (Kandori & Ohsaki, 1996). Cada flor se construyó de una caja Petri tapada con tela tul y tres círculos de papel de 3 cm de diámetro de cada color (Astrobrights Cardstock Color aid Corporation; Rodrigues & Weiss, 2012) colocados encima del tul para facilitar la alimentación. Este diseño experimental permitió evaluar si, tras la exposición al metal, las mariposas eran capaces de detectarlo y, en consecuencia, modificar su comportamiento alimentario al cambiar de color floral en busca de una fuente de néctar sin contaminantes.

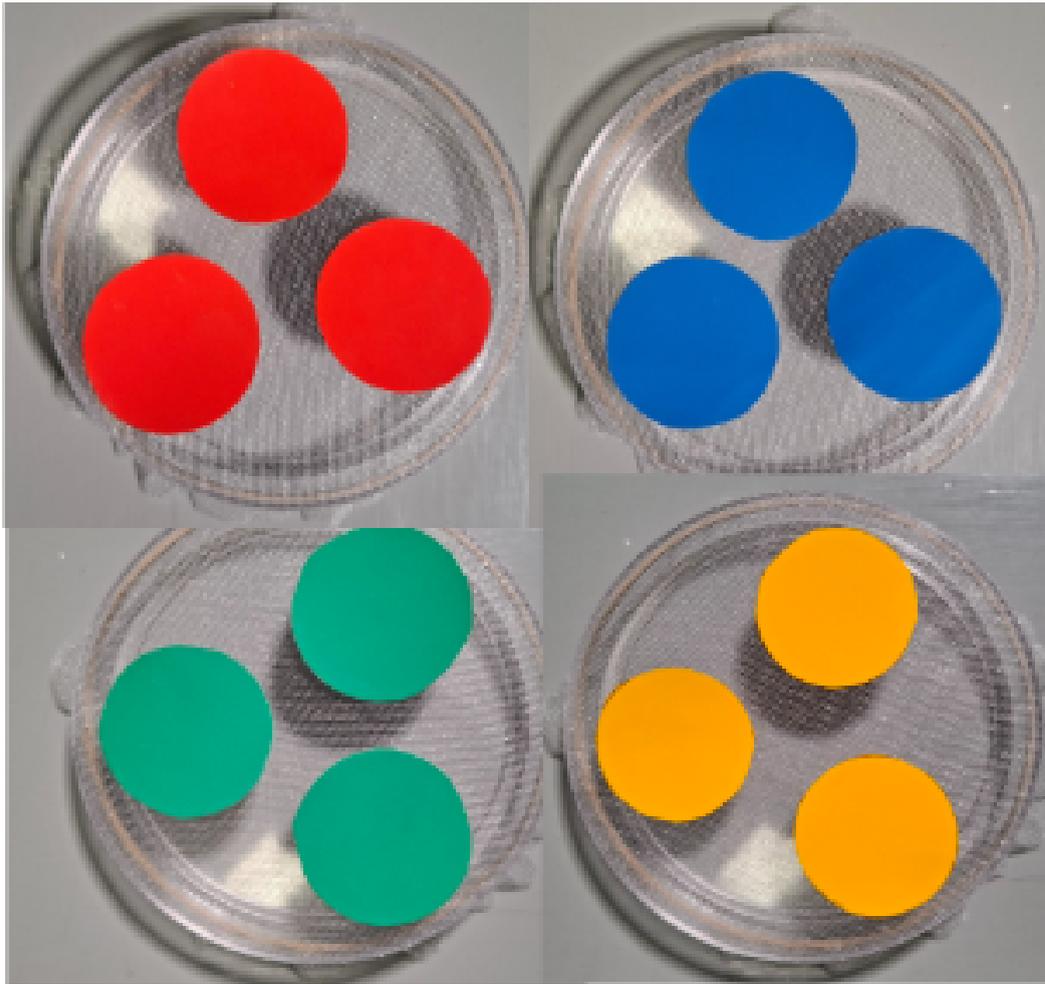


Figura 6. Flores artificiales elaboradas con cajas Petri, tela tul y círculos de diferentes colores que simulan los pétalos (autoría propia).

Pruebas preingestión

Después de haber alimentado a las mariposas durante 5 días con una solución de sacarosa al 10% en flores amarillas, estas permanecieron un día sin alimento dentro de las jaulas de tul en grupos de 6 individuos (3 réplicas para cada concentración). Posteriormente, cada grupo de 6 mariposas fue expuesto a las 4 flores artificiales, las flores de color amarillo contenían una concentración de manganeso o aluminio de acuerdo al grupo. Las flores de color verde, azul y rojo contenían únicamente agua destilada, para evitar que las asociarán a una recompensa.

Las concentraciones que se utilizaron para el manganeso fueron de 0 mg/L, 160 mg/L, 650 mg/L y 950 mg/L y para el aluminio de 0 mg/L, 240 mg/L, 650 mg/L y 800 mg/L, con agua destilada y sacarosa al 10% (Kandori et al., 2009; Snell-Rood et al. 2009; Søvik et al., 2015). Se seleccionaron estas concentraciones para abarcar el rango de las concentraciones utilizadas en el objetivo 1 (efecto de los metales en la sobrevivencia). Las jaulas se colocaron en el Laboratorio de Interacciones Biológicas del Área Académica de Biología de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, iluminadas con lámparas de luz blanca 12:12 hrs luz/ oscuridad con intensidad de 255 lúmenes (modelo SPOT PAR38 SL PROLIGHT 20W, Fig. 7).



Figura 7. Jaulas para mariposas de 30 x 30 x 30 cm utilizadas en los experimentos.

A las mariposas que descendieron en las flores artificiales, se les registraron las siguientes variables de respuesta: a) si desenrollan su proboscis, b) si introducen su proboscis en la solución y c) el tiempo durante el cual insertan su proboscis dentro de la solución durante un periodo de 5 minutos a partir del momento de la inserción (Morgano et al., 2010, Chicas-Mosier et al., 2017; 2019).

Pruebas postingestión

Un día después de haber expuesto a las mariposas a diferentes concentraciones de manganeso y aluminio, se evaluó si estas presentaban descenso en la flor amarilla, desenrollamiento de la proboscis e inserción de la

proboscis en la solución. Lo anterior para determinar si había una disminución en el interés por una solución de sacarosa al 10% y agua destilada ofrecida en las flores de color amarillo. Esta prueba se realizó para determinar si un único evento de exposición al metal es capaz de modificar el consumo de un alimento normalmente aceptable para *L. aripa* (Martinek et al., 2018). El grado de interés se cuantificó a través del tiempo durante el cual insertan la proboscis en la solución de sacarosa durante un periodo de 5 minutos.

Posteriormente se realizó una segunda prueba postingestión, la cual consistió en determinar si el tiempo durante el cual se alimentan las mariposas de una solución con el metal difiere a lo largo de 7 días de exposición. Se utilizaron 4 concentraciones de manganeso (0, 320, 640 y 1250 mg/L) y 4 concentraciones de aluminio (0, 240, 480y 950 mg/L) con agua destilada y sacarosa al 10%. Se seleccionaron estas concentraciones para abarcar el rango de las concentraciones utilizadas en el objetivo 1 (efecto de los metales en la sobrevivencia). Durante cada uno de los 7 días se le permitió a cada mariposa alimentarse en las flores amarillas durante 5 minutos de una solución con la misma concentración de metal y se registró el tiempo durante el cual se alimenta.

Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba de chi cuadrada para comparar la frecuencia de respuestas alimentarias (desenrollamiento e inserción de proboscis) entre tratamientos de ambos metales. No obstante, al observarse una respuesta uniforme (100% de respuestas positivas) en todos los tratamientos y concentraciones, el análisis resultó en valores constantes ($\chi^2 = 0$, $p = 1$), lo cual impide una interpretación estadística diferenciada entre grupos.

Para comparar el tiempo durante el cual insertan la proboscis en la solución de sacarosa 1 día después de haber sido expuestas a las diferentes concentraciones del metal (pruebas post-digestión), se utilizó una prueba ANOVA y una prueba de Tukey de comparaciones múltiples cuando el ANOVA fue

significativo. Para analizar si el tiempo durante el cual insertan la proboscis en las diferentes soluciones cambia a lo largo de 7 días se utilizó una regresión lineal y un PERMANOVA. Los análisis estadísticos se realizaron en los programas Microsoft Excel y PAST (versión 3.0). Para comprobar la normalidad de los datos, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Esta prueba permitió determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal antes de seleccionar las pruebas estadísticas posteriores.

Objetivo 3: Efecto de los metales en la constancia floral

Desarrollo de la constancia floral

Para medir el efecto de los metales en la constancia floral de las mariposas, se utilizaron 120 individuos adultos que emergieron en el laboratorio. Los adultos recién emergidos se dividieron en 2 grupos de 60 individuos (uno para el manganeso y el otro para el aluminio) y cada grupo se dividió en cuatro subgrupos de 15 individuos (uno para cada concentración de cada metal). Cada subgrupo se colocó en jaulas para mariposas de 30 x 30 x 30 cm (Fig. 7), donde permanecieron un día en ayuno. Para evitar trabajar con flores de color rojo por el que muestran preferencia innata (Muñoz et al., 2021; Valtierra & Castellanos, 2021), las mariposas fueron acondicionadas para que formaran una constancia floral a las flores artificiales de color amarillo. Durante el acondicionamiento las jaulas fueron iluminadas con lámparas de luz blanca 12:12 hrs luz/ oscuridad con una intensidad de 255 lúmenes (Modelo SPOT PAR38 SL PROLIGHT 20W).

Para acondicionar a los individuos a las flores amarillas, a estas flores se les colocó agua destilada y sacarosa al 10% y fueron ofrecidas con flores artificiales de color azul, rojo y verde, las cuales únicamente tenían agua destilada, para evitar que las relacionaran con una recompensa. Cada flor se construyó de una caja Petri tapada con tela tul (autoría propia) y tres círculos de papel de 3 cm de diámetro de cada color (Astrobrights Cardstock Color aid Corporation; Rodrigues & Weiss, 2012) colocados encima del tul para facilitar la alimentación (Fig. 6). Las soluciones se colocaron dentro de la caja Petri (Fig. 6).

Grupos de seis mariposas y 4 cajas Petri con flores artificiales de diferente color fueron introducidas dentro de jaulas de tul (Figs. 6 y 7) durante 2 h (11:00 a 13:00) iluminadas con lámparas de luz blanca 12:12 hrs luz/ oscuridad con una intensidad de 255 lúmenes (Modelo SPOT PAR38 SL PROLIGHT 20W). Este procedimiento se repitió durante 5 días, ya que 3 días son necesarios para que *L. aripa* aprenda la relación color-recompensa (Valtierra & Castellanos, 2021), lo cual también se ha visto para otra mariposa de la familia Pieridae, *Pieris napi* (Goulson & Cory, 1993). En cada día de la etapa de acondicionamiento se cambiaron de lugar las flores artificiales para evitar que los individuos formaran una memoria respecto al lugar en el que se encontraba la flor con alimento agua y sacarosa (Kandori & Ohsaki, 1996).

Exposición

Posterior a los 5 días de acondicionamiento, las mariposas pasaron un día en ayuno antes de exponerlas durante 7 días a los metales (Goulson & Cory 1993). Para exponer a las mariposas a los metales, se utilizaron flores negras para evitar que hubiera una posible relación negativa hacia el color amarillo al alimentarse de una solución con los metales. Las concentraciones de los metales que se colocaron en las flores negras fueron de 0, 320, 640 y 1250 mg/L para el manganeso y de 0, 240, 480 y 950 mg/L para el aluminio, utilizando agua destilada y sacarosa al 10%. Se seleccionaron estas concentraciones para abarcar el rango de las concentraciones utilizadas en el objetivo 1 (efecto de los metales en la sobrevivencia).

Las flores artificiales de color negro y las mariposas se colocaron dentro de jaulas de 30 x 30 x 30 cm (Fig. 7) iluminadas con lámparas de luz blanca 12:12 hrs luz/ oscuridad con una intensidad de 255 lúmenes (Modelo SPOT PAR38 SL PROLIGHT 20W). Dentro de las jaulas, a las mariposas se les permitió alimentarse durante 15 minutos de las diferentes soluciones de los metales. Terminado ese tiempo de exposición, se introdujeron las 4 flores artificiales de color azul, rojo, verde y amarillo (con solución de sacarosa al 10%) (Fig. 6) para que se alimentaran durante 25 minutos donde se registró como variable de respuesta en qué color de flor artificial descienden para alimentarse (Fig. 8). Posteriormente, se removían las 4

flores artificiales. La alimentación de las diferentes soluciones de los metales utilizando flores de color negro, la introducción de las flores de colores y el registro del color de la flor sobre la cual descienden las mariposas se realizó cada 24 horas durante 7 días.



Figura 8. Adultos de *Leptophobia aripa* alimentándose de flores artificiales de color amarillo (autoría propia).

Análisis estadísticos

Para analizar los efectos en la constancia floral se realizó una prueba de X^2 de bondad de ajuste para evaluar si la proporción de visitas a las flores de los cuatro colores difería una distribución esperada (25% cada color).

VII. RESULTADOS

Objetivo 1: Efecto de los metales en la sobrevivencia

Al analizar la relación entre la concentración de manganeso y la sobrevivencia de *L. aripa* se encontró una relación lineal negativa y significativa entre la concentración de manganeso y la sobrevivencia de los adultos ($P < 0.05$, $R^2 = 0.767$; Fig. 9, Tabla 2).

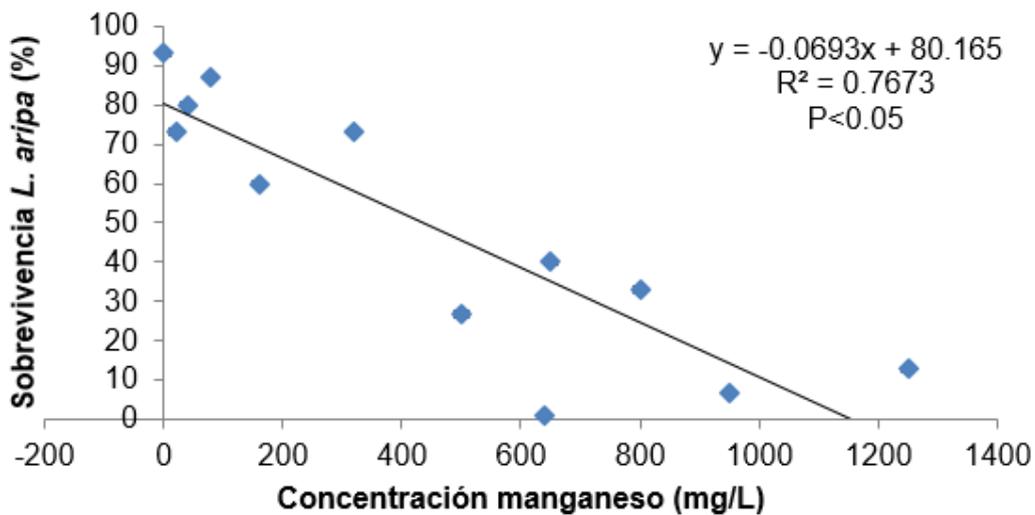


Figura 9. Relación entre la concentración de manganeso a la que fueron expuestos individuos adultos de *Leptophobia aripa* y su sobrevivencia.

Tabla 2. Valores dosis-respuesta obtenidos con adultos de *Leptophobia aripa* durante los 10 días posteriores a la exposición de diferentes concentraciones de manganeso.

Concentración (mg/L)	n	Mortalidad %	Mortalidad	Media + DE
0	45	6.67	3	1 ± 1
20	45	26.67	12	4 ± 1
40	45	20.00	9	3 ± 1
80	45	13.33	6	2 ± 2
160	45	40.00	18	6 ± 1
320	45	26.67	12	4 ± 2
640	45	100.00	45	15 ± 2
500	45	73.33	33	11 ± 2
650	45	60.00	27	9 ± 2.65
800	45	93.33	42	10 ± 2
950	45	86.67	39	14 ± 3
1250	45	66.67	30	13 ± 3.61

Nota: Se presentan los valores como media \pm desviación estándar (DE) de mortalidad por tratamiento. $n = 45$ individuos por concentración. "Mortalidad %" corresponde al porcentaje de individuos muertos respecto al total expuesto.

De igual manera se encontró una relación lineal negativa y significativa entre la concentración de aluminio y la sobrevivencia de adultos de *L. aripa* ($P < 0.05$, $R^2 = 0.611$; Fig. 10, Tabla 3).

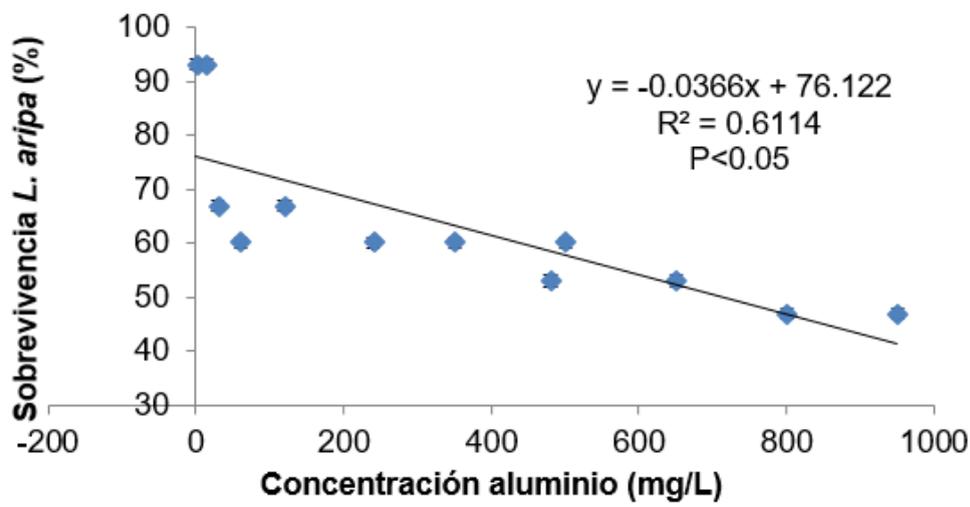


Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia de individuos adultos de *Leptophobia aripa* expuestos a concentraciones de aluminio.

Tabla 3. Valores dosis-respuesta obtenidos con adultos de *Leptophobia aripa* durante los 10 días posteriores a la exposición de diferentes concentraciones de aluminio.

Concentración (mg/L)	n	Mortalidad %	Mortalidad	Media + DE
0	45	6.67	3	1
15	45	6.67	3	1
30	45	33.33	15	5
60	45	40.00	18	6
120	45	33.33	15	5
240	45	40.00	18	6
480	45	46.67	21	7
350	45	40.00	18	6
500	45	40.00	18	6
650	45	46.67	21	7
800	45	53.33	24	8
950	45	53.33	24	8

Nota: Se presentan los valores como media \pm desviación estándar (DE) de mortalidad por

tratamiento. $n = 45$ individuos por concentración. "Mortalidad %" corresponde al porcentaje de individuos muertos respecto al total expuesto.

Objetivo 2: Detección de metales por *Leptophobia aripa*

Pruebas preingestión

El 100% de las mariposas desenrollaron su proboscis en soluciones que contenían manganeso y el 100% insertaron la proboscis en la solución con metal, la probabilidad de que este resultado se debe al azar es de 0.0005 ($X^2 = 12$, g.l. = 1). De forma similar para el aluminio, el 100% desenrollaron su proboscis en solución con el metal y el 100% insertaron la proboscis en soluciones con el metal, la probabilidad de que este resultado se debe al azar es de 0.0005 ($X^2 = 12$, g.l. = 1). En ambos metales los resultados fueron significativamente mayores a lo esperado por azar (proporción esperada del 50%).

Se encontró que el tiempo durante el cual se alimentan los adultos de *L. aripa* por primera vez de soluciones con diferentes concentraciones de manganeso (tiempo de inserción de la proboscis) no difirió significativamente ($F = 0$, g.l. = 3, $P = 1$; Fig. 11). Aunque es un resultado extremo, cumple con el requisito estadístico y refleja la total ausencia de efecto del metal sobre la conducta alimentaria.

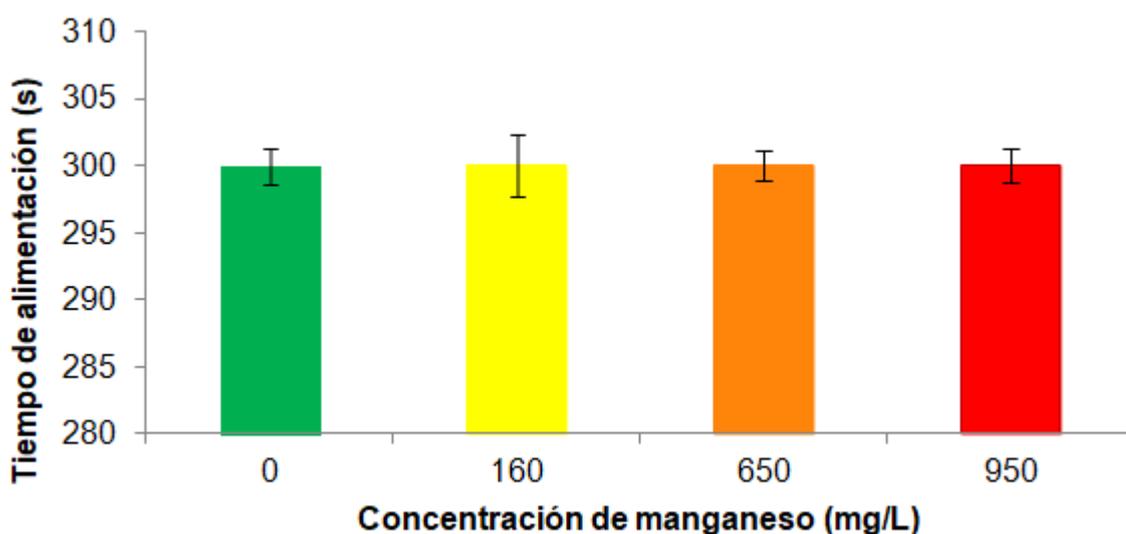


Figura 11. Tiempo de alimentación (inserción de la proboscis en la solución) de adultos de *Leptophobia aripa* en diferentes concentraciones de manganeso ($P > 0.05$). Las barras representan el error estándar del promedio.

Para el aluminio, también se encontró que el tiempo de inserción de la proboscis no difirió significativamente al alimentarse por primera vez de diferentes soluciones de este metal ($F = 0$; g.l. = 3; $P = 1$; Fig. 12).

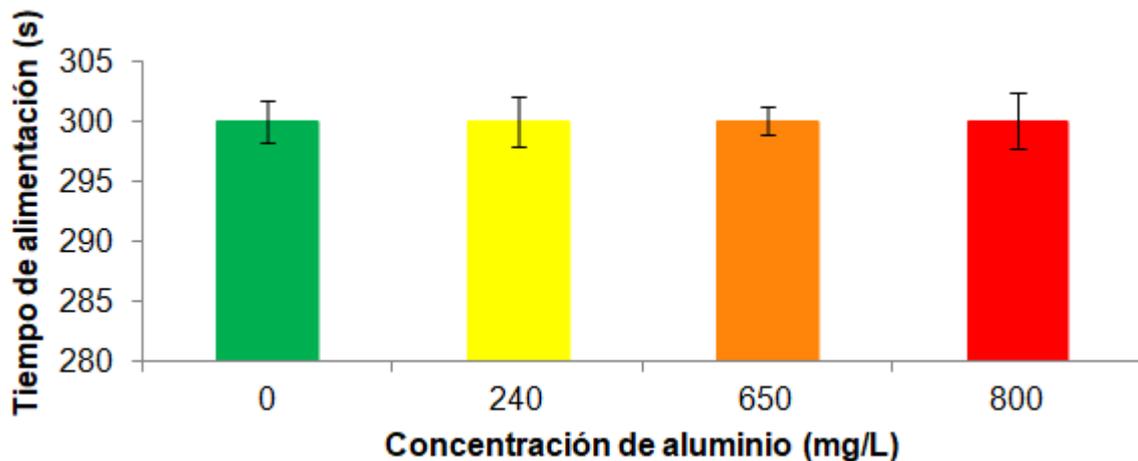


Figura 12. Tiempo de alimentación (inserción de la proboscis en la solución) de adultos de *Leptophobia aripa* en diferentes concentraciones de aluminio ($P > 0.05$). Las barras representan el error estándar del promedio.

Pruebas postingestión

Se encontró que después de 24 horas de haberse alimentado de las concentraciones utilizadas de manganeso, el tiempo de alimentación disminuyó significativamente al exponerse a una solución de sacarosa al 10% ($F = 577.4$; g.l. = 3; $P = 0.000005$; Fig. 13). El tiempo de alimentación en las concentraciones de 650 y 950 mg/L de manganeso de acuerdo con la prueba de Tukey, fue significativamente menor que en la solución de sacarosa y en la solución con 160 mg/L del metal ($P = 0.0001$) y no difirió significativamente al comparar la solución con sacarosa y la solución con 160 mg/L de manganeso ($P < 0.05$; Fig. 13).

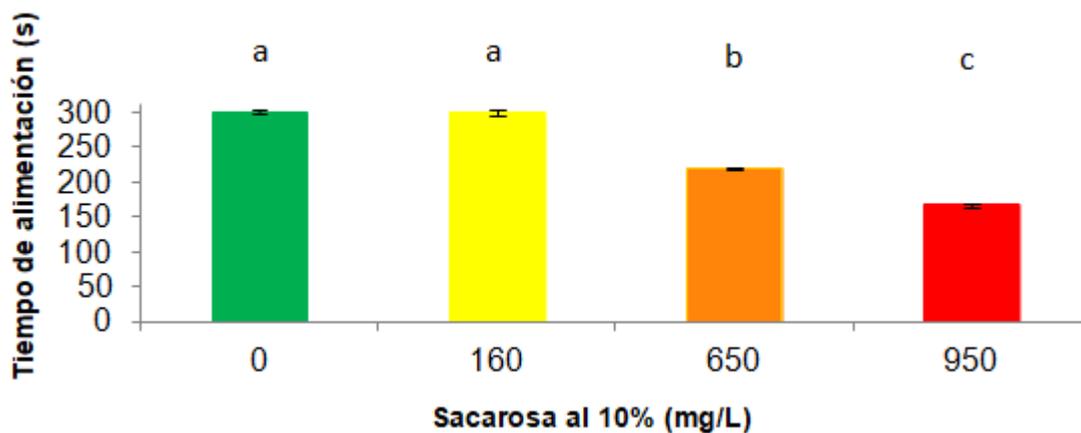


Figura 13. Tiempo de alimentación (inserción de la proboscis en la solución) de adultos de *Leptophobia aripa* en soluciones de sacarosa al 10% un día después de haber sido expuestos a diferentes concentraciones de manganeso. Letras diferentes representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras representan el error estándar del promedio.

Se encontró que, al día siguiente de haberse alimentado de las concentraciones utilizadas de aluminio, el tiempo de alimentación no disminuyó significativamente al exponerse a una solución de sacarosa al 10% ($F = 1.008$; g.l.= 3; $P = 0.3983$; Fig. 14).

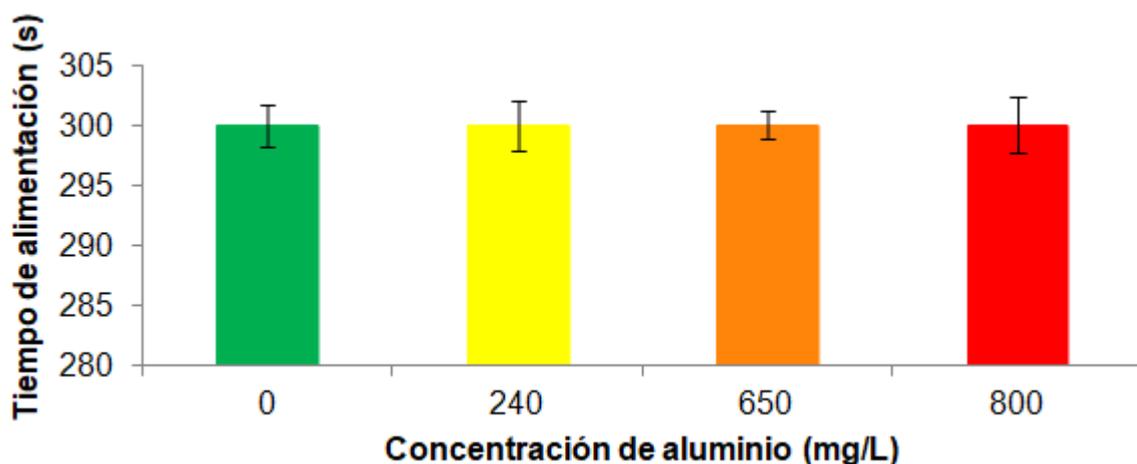


Figura 14. Tiempo de alimentación (inserción de la proboscis en la solución) de adultos de *Leptophobia aripa* en diferentes concentraciones de aluminio ($P > 0.05$). Las barras representan el error estándar del promedio.

Al analizar los tiempos de alimentación (tiempo en que mantienen la proboscis dentro de la solución) a lo largo de 7 días de exposición al manganeso, se encontró que la regresión que mejor se ajusta para explicar la relación entre la concentración del metal y el tiempo de alimentación fue una regresión cuadrática (Fig. 14). Al comparar el tiempo durante el cual insertan la proboscis en las soluciones de manganeso durante los siete días de exposición con un PERMANOVA de dos vías, se encontró que la concentración ($F = 806.81$, g.l. = 3,62, $P < 0.05$) los días de exposición ($F = 83.83$, g.l. = 6,62, $P < 0.05$) y la interacción entre ambos factores ($F = 31.74$, g.l. = 3,62, $P < 0.05$) influyen significativamente en el tiempo de alimentación de las mariposas (Fig. 15).

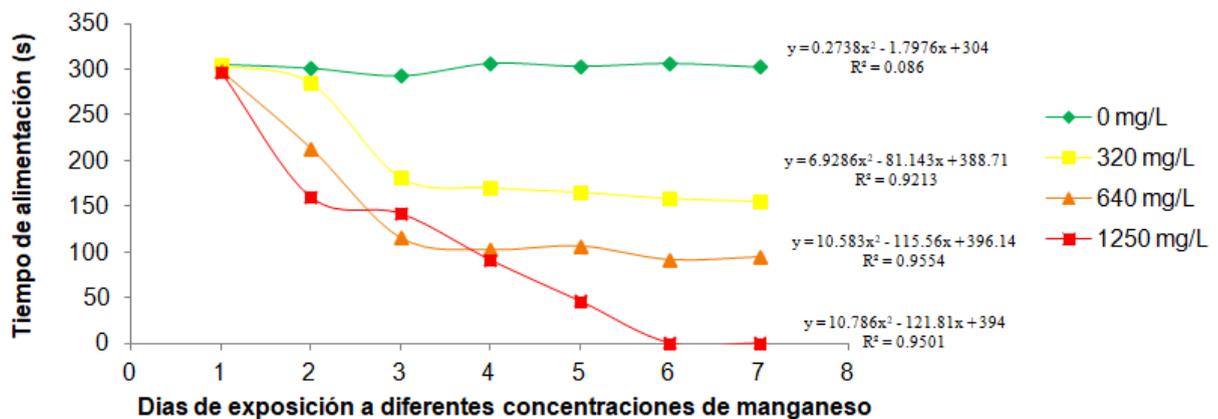


Figura 15. Tiempos de alimentación de adultos de *Leptophobia aripa* durante 7 días de exposición a diferentes concentraciones de manganeso (mg/L) con regresiones de tipo cuadrático.

Los tiempos de alimentación (tiempo en que mantienen la proboscis dentro de la solución) a lo largo de 7 días de exposición al aluminio también difirieron significativamente. La regresión que mejor se ajusta para explicar la relación entre la concentración de aluminio y el tiempo de alimentación fue una regresión cuadrática (Fig. 16). Al comparar el tiempo durante el cual insertan la proboscis en las soluciones de aluminio durante los siete días de exposición con un PERMANOVA de dos vías, se encontró que la concentración ($F = 1087.2$, g.l. = 3,133, $P < 0.05$), los días de exposición ($F = 233.54$, g.l. = 6,133, $P < 0.05$) y la interacción entre ambos

factores ($F = 53.36$, g.l. =18,133, $P < 0.05$) influyen en el tiempo de alimentación (Fig. 16).

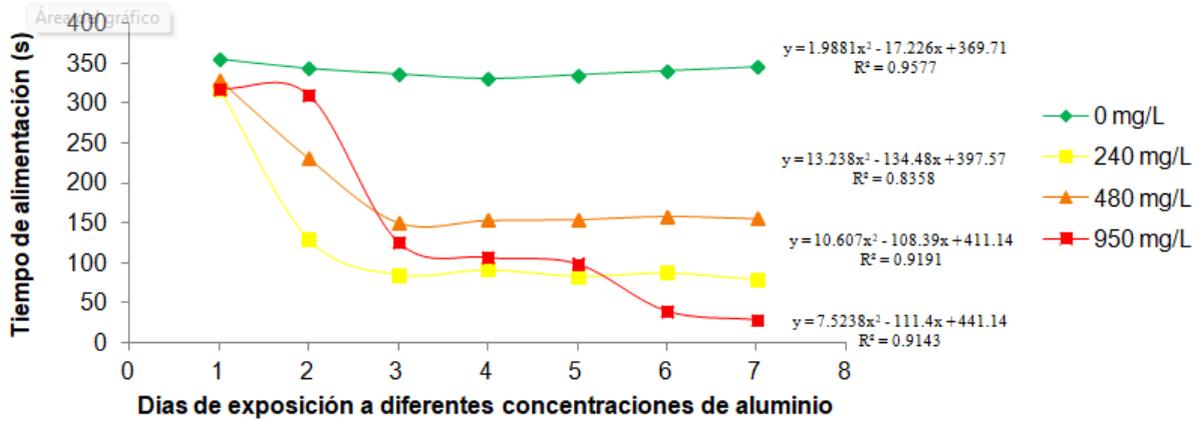


Figura 16. Tiempos de alimentación de adultos de *Leptophobia aripa* durante 7 días de exposición a diferentes concentraciones de aluminio (mg/L) con regresiones de tipo cuadrático.

Objetivo 3: Efecto de los metales en la constancia floral

No se encontró que el manganeso tuviera un efecto en la constancia floral durante 7 días de exposición al metal ya que el 100% de las mariposas descendieron en las flores artificiales de color amarillo para alimentarse ($X^2 = 45$, g.l. =3; $P = 0.0001$; Figs. 17-20). Este resultado difiere de lo esperado si las mariposas hubieran elegido al azar entre los cuatro colores, en cuyo caso se esperaba una proporción del 25% para cada color.

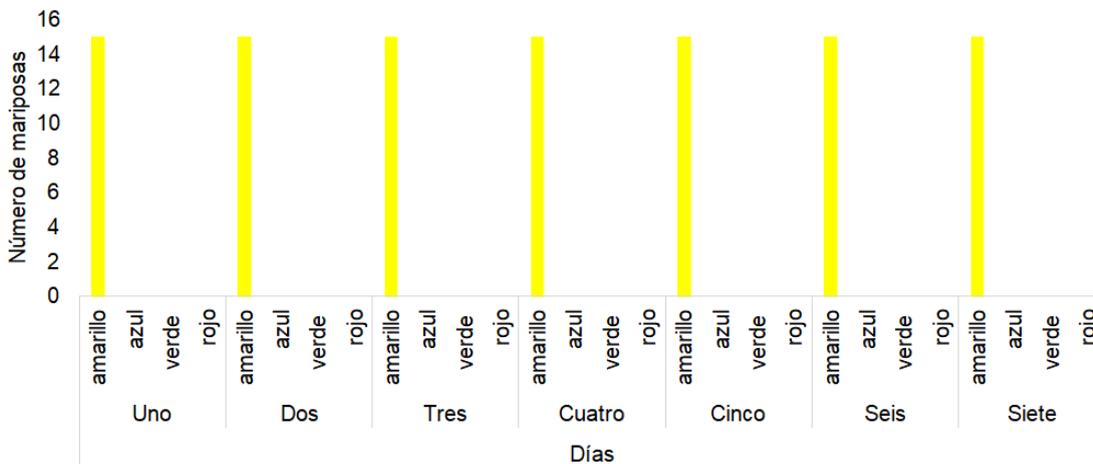


Figura 17. Número de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 0 mg/L de manganeso durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición a la sacarosa.

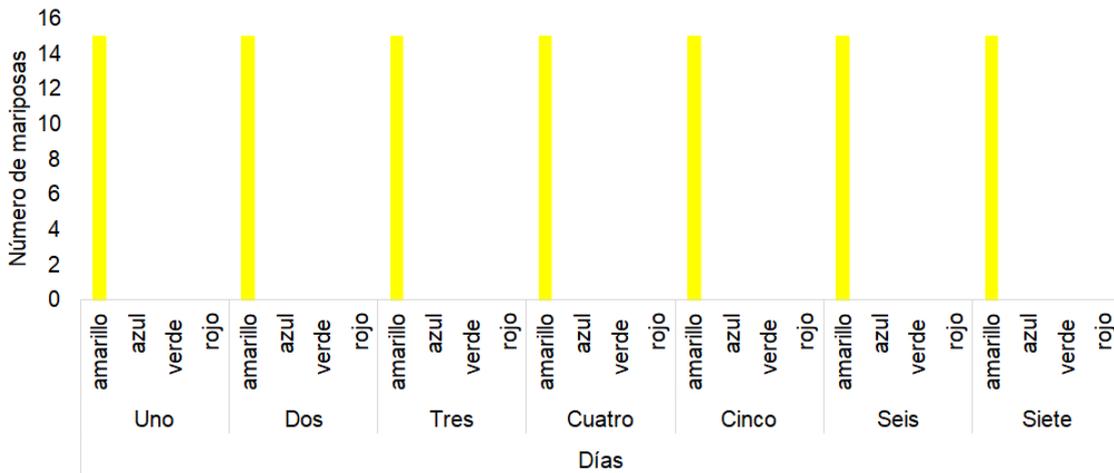


Figura 18. Número de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 320 mg/L de manganeso durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición al metal.

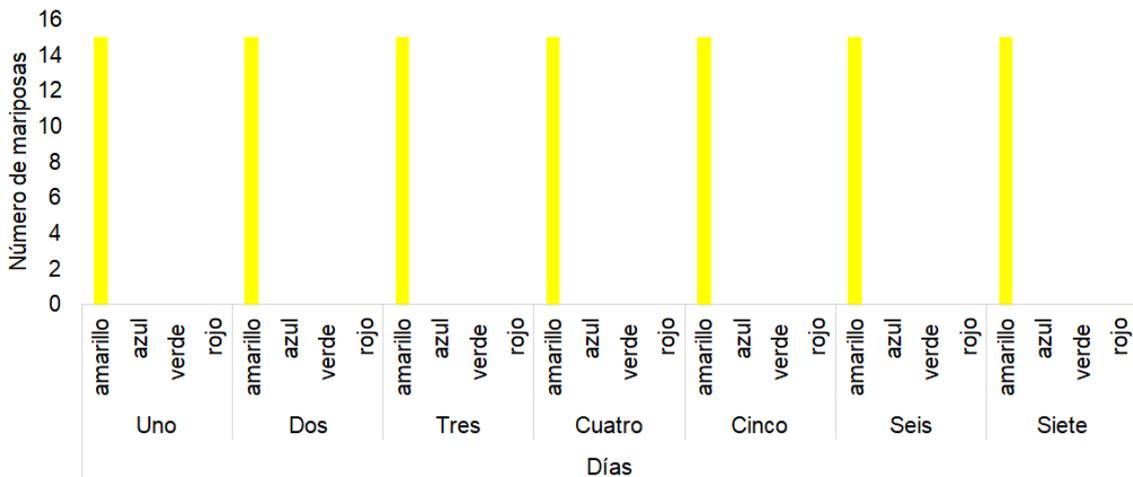


Figura 19. Número de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 640 mg/L de

manganeso durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición al metal.

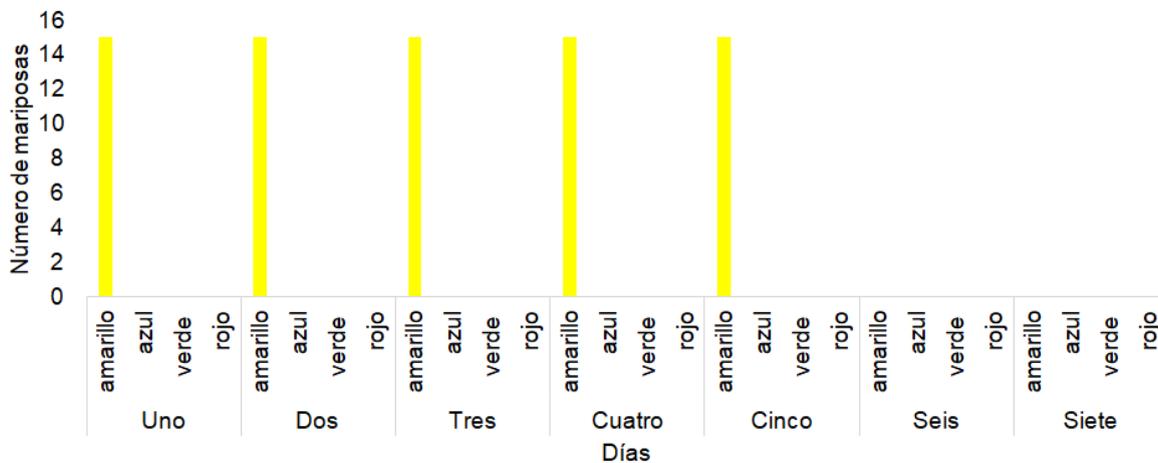


Figura 20. Número de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 1250 mg/L de manganeso durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición al metal. No se registraron elecciones en los días 6 y 7 debido a que los individuos no sobrevivieron.

No se encontró que el aluminio tuviera un efecto significativo en la constancia floral durante 1 a 7 días de exposición al metal, ya que el 100% de las mariposas descendieron en las flores artificiales de color amarillo para alimentarse ($X^2 = 45$, g.l. =3; $P = 0.0001$; Figs. 21-24). De acuerdo a la prueba, la preferencia fue significativamente diferente a lo esperado al azar.

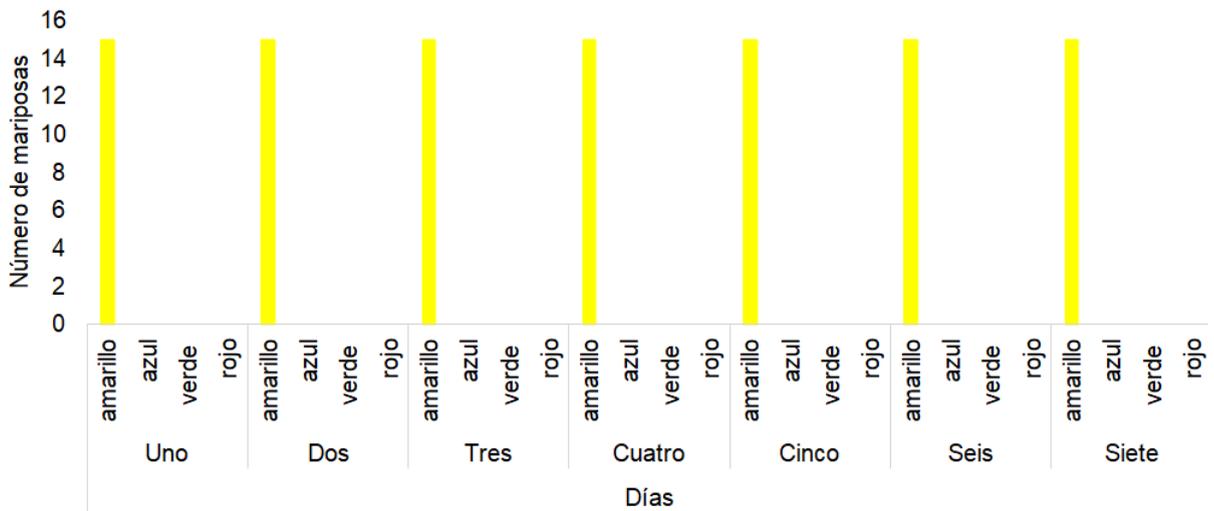


Figura 21. Porcentaje de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 0 mg/L de aluminio durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición a la sacarosa.

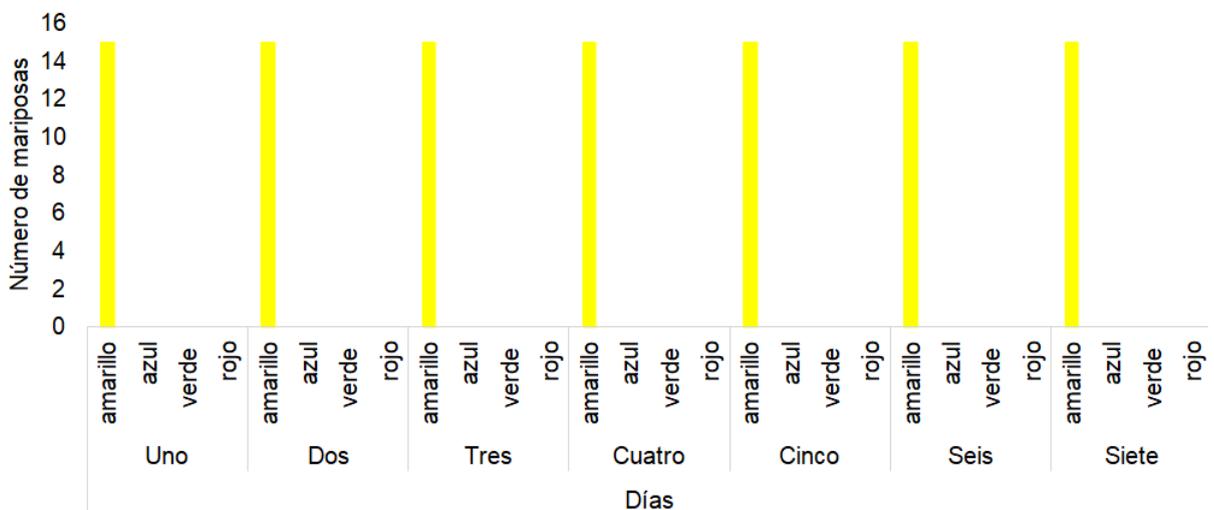


Figura 22. Porcentaje de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 240 mg/L de manganeso durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición al metal.

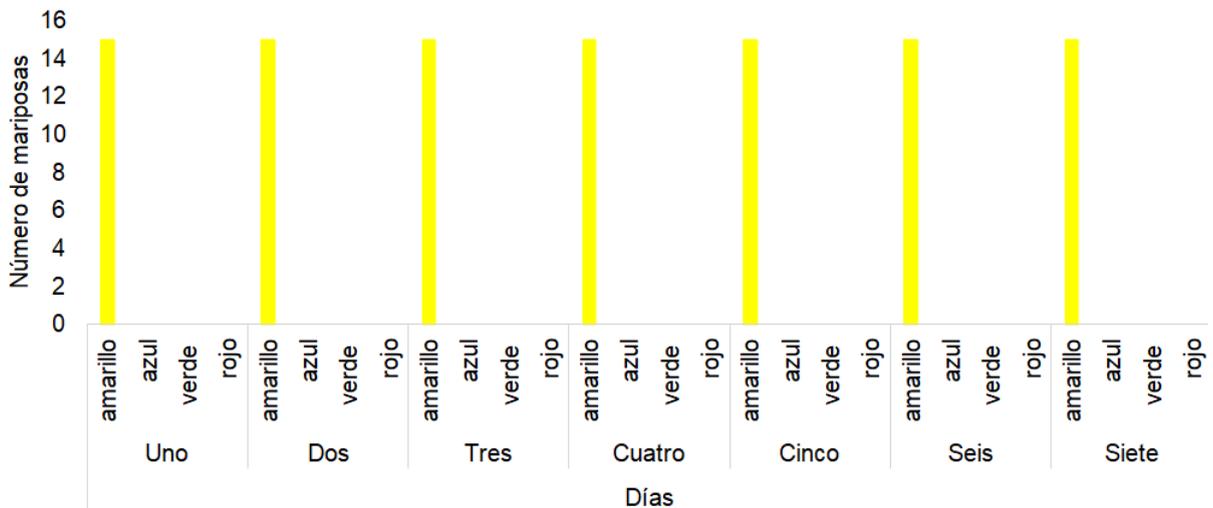


Figura 23. Porcentaje de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 480 mg/L de manganeso durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición al metal.

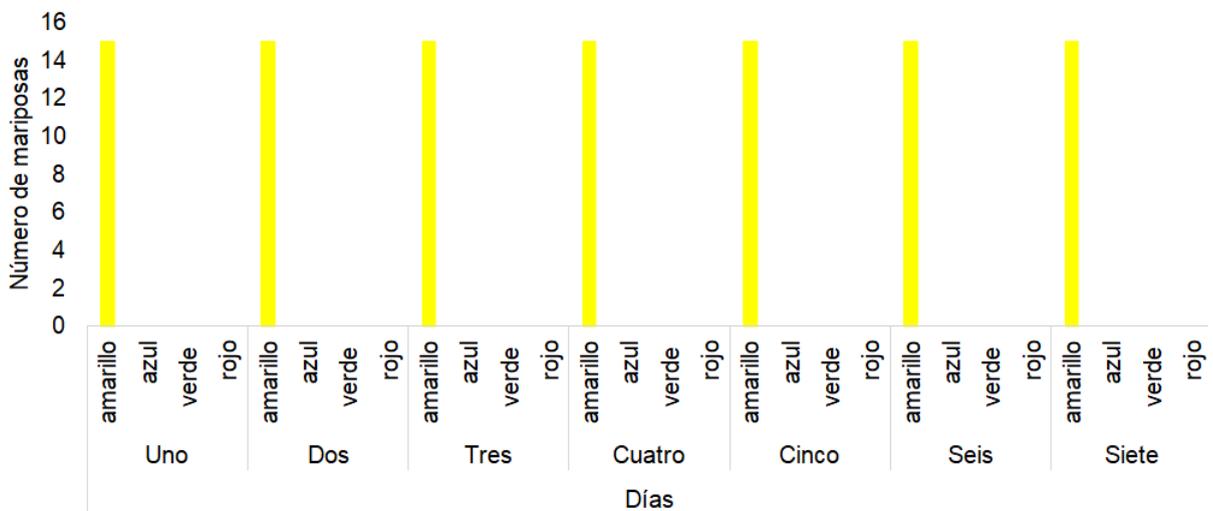


Figura 24. Porcentaje de mariposas de *Leptophobia aripa* que descendieron en flores de diferentes colores. Las mariposas previamente habían desarrollado una constancia floral al color amarillo y fueron expuestas a una concentración de 10% de sacarosa y 950 mg/L de manganeso durante 7 días. El 100% de las mariposas descendieron en la flor amarilla durante los 7 días de exposición al metal.

VIII.DISCUSIÓN

Efecto en la sobrevivencia

En este trabajo se encontró que la sobrevivencia de los adultos de *L. aripa* disminuyó conforme aumentaron las concentraciones de manganeso y aluminio, tal como se planteó en la hipótesis. Estos resultados coinciden con trabajos previos que reportan que la mortalidad de diversos grupos de insectos aumenta con la concentración de estos metales (Kuperman et al., 2004; Kijak et al., 2014; Son et al., 2016; Chicas-Mosier et al., 2019; Martinek et al., 2020).

Aunque el manganeso es un metal esencial para los insectos, la sobreexposición al metal resulta tóxica y tiende a aumentar con la concentración, sin embargo, la sensibilidad de los organismos varía en función de la presencia o ausencia de diversos mecanismos de tolerancia al metal (Martinek et al. 2020). Por ejemplo, las larvas de la polilla *Lymantria dispar* (Erebidae) pueden tolerar concentraciones de hasta 632 mg/L sin efectos adversos en su sobrevivencia debido a que durante la ecdisis, el proceso de muda en el que las larvas cambian de exoesqueleto, eliminan gran parte del manganeso acumulado en tejidos externos como la cutícula. Este mecanismo fisiológico de excreción les permite reducir la carga interna del metal y minimizar su toxicidad (Kula et al., 2014). Además, se ha reportado que la exposición al manganeso puede inducir la activación de enzimas como la Glutación S-transferasa (GST), que favorecen la desintoxicación en etapas larvales de *L. dispar*, dependiendo del tiempo y la dosis de exposición (Zeng et al., 2021). En contraste, los adultos de *L. aripa* probablemente presentan una reducida capacidad para eliminar el manganeso, en parte por la ausencia del proceso de ecdisis. Asimismo, el hecho de que los individuos analizados contaban con más de 28 días de edad podría haber influido en su sensibilidad al manganeso, ya que la toxicidad del metal aumenta con la edad de los individuos. En *Drosophila melanogaster*, por ejemplo, los efectos tóxicos del manganeso se intensifican en organismos de mayor edad debido a un incremento en el estrés oxidativo y a una reducción en la actividad de enzimas antioxidantes y en la función mitocondrial (Mohandas et al., 2017). Se ha reportado que el manganeso también puede ser

excretado y acumulado en tejidos del cuerpo para evitar sus efectos adversos; por ejemplo, los escarabajos de la especie *Phyllobius arborator* (Curculionidae) pueden tolerar concentraciones de manganeso de hasta 6335 mg/L sin efectos adversos aparentes (Martinek et al., 2017). Aunque en este trabajo no se analizaron estos mecanismos de tolerancia, es probable que los adultos de *L. aripa* no los posean ya que a partir de concentraciones de 20 mg/L, su sobrevivencia comienza a reducirse.

Las concentraciones de manganeso que afectaron negativamente a *L. aripa* son menores a las se han reportado previamente para otros insectos. Por ejemplo, la sobrevivencia de orugas de la polilla *Cabera pusaria* se redujo 50% con concentraciones de 370 mg/L (Martinek et al., 2020), la del colémbolo *Folsomia candida* se redujo 50% con concentraciones de 1209 mg/Kg (Kuperman et al. 2004), en orugas del lepidóptero *Lymantria dispar* la concentración de manganeso que redujo su sobrevivencia a 40% fue de 8000 mg/Kg, (Kula et al., 2014) y en adultos de la abeja *A. mellifera*, la concentración que redujo la sobrevivencia a 50% fue de 1294 mg/L (Khooshe et al., 2023). En comparación con *C. pusaria*, *F. candida*, *L. dispar* y *A. mellifera*, los adultos de *L. aripa* son más sensibles, debido a que la concentración de manganeso que redujo su sobrevivencia a 40% fue de 160 mg/L. Incluso, algunos autores consideran que el límite de toxicidad del manganeso para los insectos herbívoros es de 160-1000 mg/L (Kula et al., 2014; Martinek et al., 2020), por lo que se puede concluir que los adultos de *L. aripa* son considerablemente más sensibles al manganeso que los insectos herbívoros previamente evaluados. Sería interesante determinar en un estudio futuro, si la sensibilidad de *L. aripa* difiere entre adultos y larvas.

El aluminio es un elemento no esencial para los organismos y existe evidencia que su toxicidad incrementa con la concentración en diferentes grupos de insectos (Witters et al., 1984; Massie et al., 1985; Herrmann & Anderson, 1986; Kijak et al., 2014; Exley et al., 2015; Liu et al., 2018; Chicas-Mosier et al., 2019). El aluminio se une a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y reduce su actividad, lo cual provoca en los adultos de *A. mellifera* un aumento en la motilidad que genera un desgaste fisiológico y, eventualmente la muerte (Chicas-Mosier et al., 2019). En

orugas de la polilla *Bombyx mori* se encontró que el aumento en la concentración de aluminio en el alimento está asociado positivamente con el estrés oxidativo y negativamente con la viabilidad celular y la sobrevivencia (Liu et al 2018). El efecto negativo del aluminio en la sobrevivencia de *L. aripa* pudo ser influenciada por los efectos del metal en la motilidad, estrés oxidativo y sistema nervioso.

A diferencia del manganeso, la tolerancia de *L. aripa* al aluminio es mayor que la de otros insectos herbívoros previamente evaluados. Por ejemplo, en abejas de la especie *A. mellifera* se ha observado que desde concentraciones de 10.4 mg/L de aluminio, la sobrevivencia de los organismos se ve afectada negativamente (Chicas-Mosier et al., 2019) y en larvas de la polilla *Bombyx mori* una concentración de 0.5 mg/L redujo la sobrevivencia 18% (Liu et al., 2018), mientras que la sobrevivencia de los adultos de *L. aripa* fue afectada con concentraciones de aluminio mayores a 15 mg/L (Tabla 3). En *Drosophila melanogaster* la sobrevivencia del 80% se observó en la concentración de 2.70 mg/L (Massie et al., 1985) en comparación para *L. aripa* la concentración que generó una sobrevivencia del 80% fue de 30 mg/L. Con los resultados obtenidos es posible decir que, *L. aripa* es más tolerante al aluminio que *D. melanogaster*.

En América se han reportado concentraciones de aluminio de hasta 36 mg/L en flores y 22.6 mg/L en hojas, mientras que en el suelo pueden alcanzar los 5,624 mg/Kg (Meindl & Ashman, 2013). Estos niveles indican que el aluminio podría tener efectos negativos relevantes sobre mariposas silvestres como *Leptophobia aripa*, dado que en este estudio se registró una sobrevivencia del 70 % a una concentración de 30 mg/L y del 50 % a 950 mg/L.

Detección de metales por *L. aripa*.

Preingestión

Los resultados del presente trabajo sugieren que los adultos de *L. aripa* no detectan el manganeso y el aluminio la primera vez que se exponen a estos metales debido a que las mariposas presentaron el reflejo de la extensión de la proboscis y

no disminuyeron el tiempo de inserción de la proboscis en las soluciones durante su primera exposición a los metales. Estos resultados son similares a los que se han reportado en abejas cuando se exponen al aluminio ya que presentan extensión de la proboscis y tampoco reducen el consumo de alimento con este metal (Chicas-Mosier et al., 2019). Sin embargo, *L. aripa* sí presenta una disminución en el consumo de alimento contaminado con aluminio al exponerse nuevamente al metal, mientras que, en los estudios realizados con abejas y colémbolos, el consumo de alimento contaminado con aluminio no se reduce a lo largo de varios días de exposición (Kuperman et al., 2004; Meindl & Ashman 2013; Chicas-Mosier et al., 2019, 2022). Esto indica que *L. aripa* es capaz de reconocer y evitar el alimento contaminado tras una experiencia previa con el metal, lo cual sugiere un posible mecanismo de aprendizaje o memoria asociativa frente a estímulos tóxicos, a diferencia de otras especies como abejas y colémbolos que no muestran este tipo de respuesta adaptativa.

En el caso del manganeso, se han observado respuestas distintas a las encontradas en *L. aripa* de consumir menor cantidad de alimento contaminado. Por ejemplo, las orugas de la polilla *Cabera pusaria* consumen una mayor cantidad de alimento contaminado con manganeso en comparación con alimento sin el metal, al parecer, debido al alto gasto energético para eliminar el metal que las larvas acumulan en el cuerpo (Martinek et al. 2020). Los adultos de *Drosophila melanogaster* sí disminuyen el consumo de alimento contaminado con aluminio en concentraciones de 10mM en comparación con una dieta control, sin embargo, en el estudio no se especificó si la disminución en el consumo contaminado ocurre al exponer por primera vez a las moscas al metal, o se presenta un tiempo después (Bayliak et al., 2019). En otros insectos herbívoros como los adultos del escarabajo *Melolontha hippocastani*, también se ha visto que los insectos sí detectan el manganeso, ya que consumen menos alimento contaminado por manganeso, pero en concentraciones más altas que las utilizadas en el presente estudio, lo cual fue interpretado como una respuesta de rechazo por detección y posible malestar ocasionado por el metal (Martinek et al. (2018). Los resultados encontrados en *L.*

aripa sugieren que la ausencia de respuesta con un día de exposición al manganeso puede deberse a que se experimentó con adultos, a la baja sensibilidad de la especie o a que las concentraciones empleadas (160, 650 y 950 mg/L) están por debajo del umbral para ser detectadas.

Es relevante mencionar que se ha observado lo contrario en trabajos previos con larvas de las polillas *Ostrinia nubilalis* (Crambidae) y *Heliothis virescens* (Noctuidae), donde sí encontraron que la ingestión de metales provoca una disminución en el consumo del alimento en orugas (Sell & Bodznick, 1971; Gahukar, 1975). Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos con *L. aripa* podría deberse a factores como el contaminante o la etapa del ciclo de vida en la que se expusieron, ya que las larvas tienen un comportamiento y fisiología diferente.

Los resultados encontrados en *L. aripa* muestran que el no poder detectar el aluminio y manganeso la primera vez que se exponen a estos metales podría traer consecuencias negativas en ambientes contaminados, como se ha sugerido para otras especies (Rokytova et al., 2004; Mogren & Trumble 2010). Específicamente, los resultados de este trabajo muestran que los adultos de *L. aripa* que ingieren alimento contaminado con concentraciones iguales o mayores que 20 mg/L de manganeso o 30 mg/L de aluminio una sola vez durante 5 minutos tuvieron una reducción en su sobrevivencia. Estas concentraciones se encuentran dentro del rango de valores reportados para estos metales en el néctar (Ben-Shahar et al., 2004; Søvik et al., 2015; Chicas-Mosier et al., 2019).

Postingestión

Una exposición de 5 minutos a las concentraciones de 650 mg/L y 950 mg/L de manganeso generó que al día siguiente se presentara una disminución significativa en el tiempo de inserción de la proboscis en alimento no contaminado. Esta respuesta es similar a la reportada en el escarabajo *Melolontha hippocastani* donde la exposición a manganeso causó un rechazo al consumo de alimento sin este metal, posiblemente asociado a un malestar fisiológico inducido por la presencia del manganeso (Martinek et al., 2018). No se encontraron estudios que

hayan reportado que el manganeso genera una disminución significativa en el tiempo de alimentación en alimento no contaminado, pero sí para otros metales como el cadmio, cobre, plomo y selenio en *A. mellifera* (Hladun et al., 2012; Di et al., 2016). Di et al. (2022) propusieron que el comportamiento de rechazo de las abejas a la sacarosa se debe a una adaptación conductual que permite a las abejas evitar alimentos contaminados, o una respuesta de rechazo derivada de un estado fisiológico de malestar inducido por la exposición a los metales. Hladun et al. (2012) propusieron que el cambio conductual observado puede ser una respuesta adversa al selenio que podría tener consecuencias negativas a nivel de la colonia. Este efecto se manifiesta como un rechazo persistente a la sacarosa, lo que podría traducirse en una reducción de la actividad de forrajeo, en consecuencia, en una menor recolección de néctar. En los adultos de *L. aripa*, el rechazo a una solución de sacarosa después de haber consumido manganeso podría ser el resultado de una adaptación conductual que les permite a las mariposas evitar alimentos contaminados, o bien una respuesta fisiológica de rechazo asociada al malestar inducido por el metal. Este comportamiento inducido también podría tener consecuencias negativas para el individuo, ya que un rechazo persistente a la sacarosa puede comprometer la recolección de néctar, y en consecuencia, afectar su estado energético y desempeño ecológico.

Los resultados encontrados con el aluminio fueron diferentes que los resultados con el manganeso. La exposición de un día a las concentraciones utilizadas de este metal no generó un rechazo a la sacarosa en *L. aripa*. En *A. mellifera* también se ha reportado que el aluminio no provoca efectos en el tiempo de alimentación en soluciones control de sacarosa después de haber sido expuestas al aluminio, posiblemente por una compensación de la actividad mediada por la enzima AChE (Chicas-Mosier et al., 2019). Es probable que en *L. aripa*, el aluminio no provoque un estado fisiológico de malestar, o bien que exista una compensación en la actividad de la enzima AChE, lo que evitaría efectos negativos inmediatos.

Los resultados indican que los adultos de *Leptophobia aripa* redujeron progresivamente su tiempo de alimentación tras una exposición continua a metales durante siete días. Esta disminución podría estar relacionada con un malestar fisiológico acumulado, derivado de la exposición prolongada. Un fenómeno similar ha sido reportado en orugas de *Lymantria dispar* expuestas al manganeso, en las que se observó que este metal interfiere con el transporte y metabolismo de coenzimas intestinales, lo que afecta su nutrición y, en consecuencia su capacidad alimenticia (Zeng et al., 2021).

En dosis altas de aluminio la motilidad en el comportamiento de forrajeo en *A. mellifera* se ve afectada lo cual se ha relacionado a un posible agotamiento posterior a la exposición (Chicas-Mosier et al., 2019). Por lo tanto, la reducción en el tiempo de alimentación a lo largo de una semana de exposición encontrada en *L. aripa* pudo deberse a que el aluminio causa un efecto similar en las mariposas. La reducción en la alimentación en *L. aripa* también pudo deberse a un efecto de aluminio en la enzima AChE la cual es vital para la contracción muscular y en el correcto funcionamiento del sistema hormonal de insulina, que en conjunto puede generar una menor motilidad e incapacidad de elegir el mejor alimento (Kaptanoğlu et al., 2007).

Estudios anteriores han propuesto mecanismos para explicar cómo los metales afectan el comportamiento alimentario de los insectos. Al exponer a *A. mellifera* a cadmio se observó una reducción en su capacidad de recolectar alimento debido a alteraciones neurológicas y motoras (Hladun et al., 2012). De manera similar Di et al. (2016) reportaron consecuencias negativas en la locomoción y comportamiento de forrajeo en abejas relacionado a una posible disfunción neuromuscular. Messchendorp et al. (2000) sugirieron que la exposición prolongada a metales altera la actividad motora y la sensorial, resultando en la incapacidad en insectos de detectar y seleccionar fuentes de alimento. Estos hallazgos sugieren que los efectos observados en *L. aripa* en la disminución en el tiempo de alimentación podría deberse a alteraciones neurológicas, percepción del alimento y malestar fisiológico causados por la exposición a manganeso y aluminio.

La disminución en los tiempos de alimentación observada en *L. aripa* en ambos metales en todas las concentraciones evaluadas sugiere que la especie es capaz de detectar el manganeso y el aluminio, posiblemente de manera independiente de la concentración y el tiempo de exposición. En *A. mellifera* se ha estudiado su capacidad de detección de metales, evaluando el tiempo de alimentación (Burden et al., 2019). Si el organismo modifica su tiempo de alimentación entonces es capaz de detectar el contaminante en el alimento (Burden et al., 2019).

Aunque los tiempos de alimentación en ambos metales disminuyeron a lo largo de los 7 días de exposición, *L. aripa* siguió presentando el reflejo de la extensión e inserción de la proboscis. Este resultado puede deberse a la disponibilidad de alimento. De las flores artificiales que tenían disponibles solo la que contenía sacarosa al 10% más la concentración del metal representaba una fuente de alimento. En abejas se ha visto que si no hay recursos disponibles es más probable que se alimenten de soluciones contaminadas, por lo que si *L. aripa* se seguía alimentando podría deberse a la falta de recursos y no a la incapacidad de detectar los metales utilizados (Desmedt et al., 2016).

Con base en lo anterior se decidió realizar una exposición de un día como punto de partida para ver los efectos en el comportamiento después de un único evento. La exposición de siete días se realizó para acercarse más a la realidad a la que se pueden enfrentar los polinizadores en el medio (Chicas-Mosier et al., 2019). Los resultados de un día permiten observar los efectos del manganeso y el aluminio si *L. aripa* se expone de manera aguda a los contaminantes al visitar por azar una fuente de alimento contaminada. Es decir, el riesgo que representan estos contaminantes aun con una exposición breve. La exposición de 7 días permite observar los efectos que generan estos metales en poblaciones de *L. aripa* que viven en una zona contaminada.

Efecto de los metales en la constancia floral

Se esperaba que al aumentar las concentraciones de manganeso se perdiera la memoria del color de la flor con el que *L. aripa* adquirió una constancia floral. Sin embargo, los resultados muestran que con 7 días de exposición a manganeso las mariposas seguían visitando las flores de color amarillo, a pesar de tener alternativas.

En polinizadores como las abejas se ha encontrado que algunas sustancias tóxicas en concentraciones subletales son capaces de afectar la constancia floral (Chicas-Mosier et al., 2017). Sin embargo, en este trabajo se encontró que los adultos de *L. aripa* después de una exposición de una semana a manganeso y aluminio siguieron presentando una constancia floral a las flores artificiales de color amarillo. Por lo tanto, es posible que el manganeso y aluminio no afecten la memoria de mariposas como *L. aripa*.

Las concentraciones utilizadas en el presente trabajo tuvieron efectos en la sobrevivencia y en el comportamiento alimentario, pero no en la constancia floral. El que el manganeso y aluminio en las concentraciones utilizadas no afectaran la constancia floral puede deberse a que no eran lo suficientemente altas para generar efectos en la memoria, como en el estudio de Karahan et al., (2015) donde no observaron efectos del imidacloprid en la constancia floral de las abejas. Caso contrario a lo observado en el trabajo de Chicas-Mosier et al., (2017) donde vieron un efecto del aluminio en la constancia floral en abejas con una sola dosis. Es probable que el aluminio modifique la percepción del sabor dulce y aumente la probabilidad de forrajear en lugares contaminados. El que *L. aripa* mantuviera constancia floral durante la semana de exposición podría deberse a la incapacidad de asociar el metal con un color, lo que impediría asociar la característica floral con consecuencia negativas. Esta interpretación es consistente con lo reportado por Chicas-Mosier et al. (2019), donde observaron que las abejas no evitaron activamente el alimento contaminado.

Una interpretación alternativa para explicar por qué no se encontró que los metales afectaran la constancia floral en *L. aripa* durante la semana de exposición,

es que el manganeso y aluminio afecten la memoria a corto plazo. Si se compromete la capacidad de recordar asociaciones negativas, las mariposas podrían no relacionar el color amarillo con consecuencias adversas, y por ende seguirían visitando el alimento contaminado. Efectos en la memoria se han reportado en abejas expuestas a aluminio, donde continúan regresando a flores contaminadas, posiblemente debido a déficits en la memoria ocasionados por el metal o por insecticidas (Williamson & Wright, 2013; Chicas-Mosier et al., 2017). En este contexto, la preservación de la constancia floral en *L. aripa* podría ser resultado de un efecto neurotóxico comparable.

A pesar de los estudios realizados sobre los efectos de metales en polinizadores como abejas y abejorros, son escasos los trabajos que aborden los efectos de estos contaminantes en mariposas adultas. Por ello, el presente estudio brinda información valiosa sobre las consecuencias de los metales en la sobrevivencia y comportamiento alimentario de mariposas adultas, específicamente la especie *L. aripa*.

El efecto en la sobrevivencia, el cambio en su tiempo de alimentación y capacidad de detección del recurso sugieren que incluso eventos puntuales de contaminación pueden repercutir negativamente en interacciones planta-polinizador. Considerando que muchas mariposas comparten mecanismos fisiológicos y comportamentales similares, es plausible que estas alteraciones puedan extrapolarse a otras especies silvestres bajo condiciones comparables. Sin embargo, en ambientes naturales, los insectos están expuestos a múltiples factores de estrés de forma crónica, lo que puede amplificar o disminuir estos efectos.

Por ello, se recomienda que futuros estudios evalúen los impactos de exposiciones en condiciones más cercanas a las del campo, y consideren otros aspectos ecológicos relevantes como la disponibilidad floral, la competencia con otros polinizadores y la variabilidad ambiental.

IX. CONCLUSIONES

La sobrevivencia de *Leptophobia aripa* disminuyó conforme aumentó la concentración de manganeso y aluminio, lo que respalda su efecto tóxico bajo condiciones de exposición aguda.

Leptophobia aripa no mostró evidencia de detectar la presencia de manganeso ni de aluminio en el alimento durante la primera exposición a estos metales.

Las mariposas exhibieron un posible efecto condicionado, manifestado como una reducción en el consumo de sacarosa 24 horas después de ingerir las concentraciones más altas de manganeso; este efecto no se observó en ninguna de las concentraciones de aluminio.

A partir del segundo día de exposición, *Leptophobia aripa* mostró una disminución progresiva en el tiempo de alimentación tanto con manganeso como con aluminio.

Ninguna de las concentraciones evaluadas de manganeso y aluminio afectó la constancia floral en *Leptophobia aripa*, lo que indica que la preferencia por la fuente floral no se ve alterada por la presencia de estos metales en el alimento.

X. LITERATURA CITADA

- Agnihotri, A. & Seth, C. (2019). Transgenic Brassicaceae: A promising approach for phytoremediation of heavy metals. (M. N. V. Prasad, Ed.), Transgenic plant technology for remediation of toxic metals and metalloids. Academic Press, 239-255.
- Aguado Martín, L., Fereres Castiel, A. & Viñuela Sandoval, E. (2015). Guía de campo de los polinizadores de España. Ediciones Mundi-Prensa, 15-46.
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9: 42.
- Ali, S., Ullah, M. I., Saeed, M. F., Khalid, S., Saqib, M., Arshad, M., Afzal, M. & Damalas, C. A. (2019). Heavy metal exposure through artificial diet reduces growth and survival of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 14426-14434.
- Al-Lozi, A., Nielsen, S. S., Hershey, T., Birke, A., Checkoway, H., Criswell, S. R., & Racette, B. A. (2017). Cognitive control dysfunction in workers exposed to manganese-containing welding fume. *American Journal of Industrial Medicine*, 60: 181-188.
- Al-Najar, H., Kaschl, A., Schulz, R. & Römheld, V., (2005). Effects of thallium fractions in the soil and pollution origin in thallium uptake by hyperaccumulator plants: a key factor for assessment of phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation*, 7: 55-67.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (2008). Toxicological Profile for Aluminum. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Atlanta, Georgia, EUA.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (2012). Toxicological Profile for Manganese. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Atlanta, Georgia, EUA.
- Bahadorani, S. & Hilliker, A. J. (2009). Biological and behavioral effects of heavy metals in *Drosophila melanogaster* adults and larvae. *Journal of Insect Behavior*, 22: 399-411.

- Bayliak, M. M., Lylyk, M. P., Gospodaryov, D. V., Kotsyubynsky, V. O., Butenko, N. V., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2019). Protective effects of alpha-ketoglutarate against aluminum toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 217: 41-53.
- Bayley, M., Baatrup, E., Heimbach, U., & Bjerregaard, P. (1995). Elevated copper levels during larval development cause altered locomotor behavior in the adult carabid beetle *Pterostichus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32(2): 166-170.
- Behmer, S. T., Lloyd, C. M., Raubenheimer, D., Stewart-Clark, J., Knight, J., Leighton, R. S., H...arper, F. A. & Smith, J. A. C. (2005). Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Functional Ecology*, 19: 55-66.
- Ben-Shahar, Y. (2018). The impact of environmental manganese exposure on insect biology. *Frontiers in Genetics*, 9: 1-7.
- Ben-Shahar, Y., Dudek, N. & Robinson, G. (2004). Phenotypic deconstruction reveals involvement of manganese transporter malvolio in honey bee division of labor. *Journal of Experimental Biology*, 207: 3281-3288.
- Bernays, E. A. & Chapman, R. F. (1994). Host-plant selection behaviour of phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.
- Bird, E. D., Anton, A. H. & Bullock, B. (1984). The effect of manganese inhalation on basal ganglia dopamine concentrations in rhesus monkey. *Neurotoxicology*, 5: 59-65.
- Boyd, R., David, M., Wall, M. & Ballwill, K. (2002). Nickel defends the south african hyperaccumulator *senecio coronatus* (Asteraceae) against *Helix aspersa* (Mollusca: Pulmonidae). *Chemoecology*, 12: 91-97.
- Bonilla-Ramirez, L., Jimenez-Del-Rio, M. & Velez-Pardo, C. (2011). Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. *Biometals*, 24: 1045-1057.
- Bradl, H. B. (2005). Sources and origins of heavy metals. In *interface science and technology. heavy metals in the environment: Origin, Interaction and Remediation*, 6: 1-27.

- Burden, C., Elmore, C., Hladun, K., Trumble, J., & Smith, B. (2016). Acute exposure to selenium disrupts associative conditioning and long-term memory recall in honey bees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127: 71-79.
- Burden, C., Morgan, M., Hladun, K., Amdam, G., Trumble, J., & Smith, B. (2019). Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) Feeding Behavior. *Scientific Reports*, 9: 1-10.
- Bustillo, A. E., & De Gutiérrez, B. (1975). Ciclo de vida del *Leptophobia aripa* (Boisduval) (Lepidoptera: Pieridae) plaga del repollo y la col. *Revista Colombiana de Entomología*, 1: 1-5.
- Candia-Puma, M. A. & Ramírez-Choquehuanca, J. K. (2016). Efecto del manganeso y plomo sobre la viabilidad de células de neuroblastoma humanas SH-SY5 y de Ratas B-35, Universidad Católica Santa María.
- Cañadas, S. O., & de Gortari, E. D. V. (2025). Polinizadores de huertos urbanos y periurbanos en la ciudad de Morelia (Michoacán, México). *Etnobiología*, 23: 166-180.
- Cao, Z., Yang, X., Zhang, H., Wang, H., Huang, W., Xu, F., Zhuang, C., Wang, X. & Li, Y. (2016). Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere*, 151: 289-295.
- Carbó-Ramírez, P., & Zuria, I. (2011). The value of small urban greenspaces for birds in a Mexican city. *Landscape and Urban Planning*, 100: 213-222.
- Cashion, M. F., Banks, W. A., & Kastin, A. J. (1996). Sequestration of centrally administered insulin by the brain: effects of starvation, aluminum, and TNF- α . *Hormones and Behavior*, 30: 280-286.
- Chapman, R. F. (2003). Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 48: 455-484.
- Chicas-Mosier, A. M., Cooper, B. A., Melendez, A. M., Pérez, M., Oskay, D., & Abramson, C. I. (2017). The effects of ingested aqueous aluminum on floral fidelity and foraging strategy in honey bees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143: 80-86.
- Chicas-Mosier, A. M., Dinges, C. W., Agosto-Rivera, J. L., Giray, T., Oskay, D., & Abramson, C. I. (2019). Honey bees (*Apis mellifera* spp.) respond to increased

- aluminum exposure in their foraging choice, motility, and circadian rhythmicity. *Plos One*, 14, e0218365.
- Chicas-Mosier, A. M., Black, T. E., Hester, K. P., Belzunces, L. P., & Abramson, C. I. (2022). Honey bee (*Apis mellifera* ligustica) acetylcholinesterase enzyme activity and aversive conditioning following aluminum trichloride exposure. *Bmc Zoology*, 7: 1-12.
- Cornelis, R., & Nordberg, M. (2007). General chemistry, sampling, analytical methods, and speciation. (G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg & L. Friberg, eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, 29-32.
- Crossgrove, J., & Zheng, W. (2004). Manganese toxicity upon overexposure. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance in vivo*, 17: 544-553.
- Grześ, I. M. (2010). Ants and heavy metal pollution—a review. *European Journal of Soil Biology*, 46: 350-355.
- Dawkins, M. (1971). Perceptual changes in chicks: another look at the “search image” concept. *Animal Behavior*, 566-574.
- Desmedt, L., Hotier, L., Giurfa, M., Velarde, R., & de Brito Sanchez, M. G. (2016). Absence of food alternatives promotes risk-prone feeding of unpalatable substances in honey bees. *Scientific Reports*, 6.
- Després, L., David, J. P., & Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 298-307.
- Di, N., Hladun, K. R., Zhang, K., Liu, T.-X., & Trumble, J. T. (2016). Laboratory bioassays on the impact of cadmium, copper and lead on the development and survival of honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae and foragers. *Chemosphere*, 152: 530-538.
- Exley, C., Rotheray, E., & Goulson, D. (2015). Bumblebee pupae contain high levels of aluminium. *PLoS One*, 10(6), e0127665.
- Feng, R., Chen, L., & Chen, K. (2021). Cytotoxicity and changes in gene expression under aluminium potassium sulfate on *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Ecotoxicology*, 30: 2056-2070.

- Fisher, B. L. (1998). Insect behavior and ecology in conservation: preserving functional species interactions. *Annals of the Entomological Society of America*, 91: 155-158.
- Fordahl, S., Anderson, J., Cooney, P., Weaver, T., Colyer, C., & Erikson, K. (2010). Manganese exposure inhibits the clearance of extracellular GABA and influences taurine homeostasis in the striatum of developing rats. *Neurotoxicology*, 31: 639-646.
- Freeman, J. L., Quinn, C. F., Marcus, M. A., Fakra, S., & Pilon-Smits, E. A. H. (2006). Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Current Biology*, 16: 2181-2192.
- Gahukar, R. T. (1975). Effects of dietary zinc sulphate on the growth and feeding behaviour of *Ostrinia nubilalis* Hbn.(Lep., Pyraustidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 79: 352-357.
- Gall, E. & Rajakaruna, N. (2013). The physiology, functional genomics, and applied ecology of heavy metal-tolerant Brassicaceae In: *Brassicaceae: Characterization, Functional Genomics and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Inc 121.
- Gall, J., Boyd, R., & Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 201.
- Glendinning, J. I. (2002). How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104: 15-25.
- Gómez-Sánchez, A. & Castellanos, I. (2025). Sensibilidad de *Apis mellifera* a metales pesados. XVII Foro de proyectos científicos. Área Académica de Biología. Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Goulson, D. & Cory, J. (1993). Flower constancy and learning in foraging preferences of the green-veined white butterfly *Pieris napi*. *Ecological Entomology*, 18: 315-320.
- Grześ, I. M. (2010). Ants and heavy metal pollution-a review. *European Journal of Soil Biology*, 46: 350-355.
- Hainsworth, F. R., E. Precup, & T. Hamill. (1991) Feeding, energy processing rates and egg production in painted lady butterflies. *Journal of Experimental Biology*, 156: 240-265.

- Hernández-Acosta, E., Mondragón-Romero, E., Cristobal-Acevedo, D., Rubiños-Panta, J.E., Robledo-Santoyo, E., (2009). Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 15 (2): 109-114.
- Hernández-Medina, M. E., Pimentel, J. V. M., Castellanos, I., Zuria, I., Sánchez-Rojas, G., & Oyarzún, J. C. G. (2025). Metal concentration in honeybees along an urbanization gradient in Central Mexico. *Environmental Research* 264: 120199.
- Herrmann, J., & Andersson, K. G. (1986). Aluminium impact on respiration of lotic mayflies at low pH. *Water, Air, and Soil Pollution*, 30: 703-709.
- Hladun, K. R., Di, N., Liu, T. X., & Trumble, J. T. (2016). Metal contaminant accumulation in the hive: Consequences for whole-colony health and brood production in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35: 322-329.
- Hladun, K. R., Parker, D. R., Tran, K. D., & Trumble, J. T. (2013). Effects of selenium accumulation on phytotoxicity, herbivory, and pollination ecology in radish (*Raphanus sativus* L.). *Environmental Pollution*, 172: 70-75.
- Hladun, K. R., Smith, B. H., Mustard, J. A., Morton, R. R., & Trumble, J. T. (2012). Selenium toxicity to honey bee (*Apis mellifera* L.) pollinators: effects on behaviors and survival. *PLoS One*, 7: e34137.
- Hladun, K. R., Kaftanoglu, O., Parker, D. R., Tran, K. D. & Trumble, J. T. (2013). Effects of selenium on development, survival, and accumulation in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology Chemistry*, 32: 2584-2592.
- Irving, E. C., Baird, D. J., & Culp, J. M. (2003). Ecotoxicological responses of the mayfly *Baetis tricaudatus* to dietary and waterborne cadmium: implications for toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22: 1058-1064.
- INE-SEMARNAT, M. (2003). DF Introducción al análisis de riesgos ambientales
- INEGI (2015) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México- Encuesta Intercensal 2015. Consultado 8 mayo 2023. https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/inter_censal/estados2015/702825079789.pdf.

- INEGI. (2010). Cuaderno Estadístico Municipal, Pachuca de Soto, Estado de Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Ingerman, L., Jones, D. G., Keith, S. & Rosemond, Z.A. (2008). Toxicological profile for aluminum. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 25-70.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017). Anuario Estadístico y Geográfico de Hidalgo 2017. Recuperado 12 de junio de 2021 de: <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825095093>.
- Islam, S. J., Manna, P., Unni, B., & Kailta, J. (2019). Higher concentrations of heavy metals impair antioxidant defense mechanism and growth response of muga silkworm, *Antheraea assamensis* (Lepidoptera: Saturniidae). Journal of Entomology and Zoology Studies, 7(2), 715-724.
- Jaffre, T., Brooks, R. R., Lee, J., & Reeves, R. D. (1976). *Sebertia acuminata*: A nickel accumulating plant from New Caledonia. Science, 193: 579-580.
- Jara, F. M. (2018). Evaluación de tres dosis de fumigación con fosforo de aluminio en almacenamiento de maíz (*Zea mays*) para controlar la incidencia de *Sitophilus* spp. Escuela Agrícola Panamericana.
- Janssens, T. K. S., Roelofs, D., & van Straalen, N. M. (2009). Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. Insect Science, 16: 3-18.
- Kabata-Pendias, A. (2000). Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton. USA. 365-413.
- Kandori, I. & Ohsaki, N. (1996). The learning abilities of the white cabbage butterfly, *Pieris rapae*, foraging for flowers. Research on Population Ecology, 38: 111-117.
- Kandori, I., Yamaki, T., Okuyama, S. I., Sakamoto, N., & Yokoi, T. (2009). Interspecific and intersexual learning rate differences in four butterfly species. Journal of Experimental Biology, 212: 3810-3816.
- Kaptanoğlu, B., Turgut, S., Turgut, G., Emmungil, G., & Demir, S. (2007). Effects of aluminum on insulin-like growth factor I levels and antioxidant status. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 18: 245-254.
- Karahan, A., Çakmak, I., Hranitz, J. M., Karaca, I., & Wells, H. (2015). Sublethal imidacloprid effects on honey bee flower choices when foraging. Ecotoxicology, 24: 2017-2025.

- Kay, K. & Sargent, R (2009). The role of animal pollination in plant speciation: integrating ecology, geography, and genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40: 637-656.
- Kazemi-Dinan, A., Thomaschky, S., Stein, R. J., Krämer, U., & Müller, C. (2014). Zinc and cadmium hyperaccumulation act as deterrents towards specialist herbivores and impede the performance of a generalist herbivore. *New Phytologist*, 202: 628-639.
- Khooshe-Bast, Z., Sahebzadeh, N., Haddadi, M., & Khani, A. (2023). Potential of whey protein as a nutritional intervention in alleviating manganese and paraquat-mediated oxidative stress in *Apis mellifera* meda. *Apidologie*, 54: 8.
- Khoury, D., Myerscough, M., & Barron, A. (2011). A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *PloS One*, 6: e18491.
- Kijak, E., Rosato, E., Knapczyk, K., & Pyza, E. (2014). *Drosophila melanogaster* as a model system of aluminum toxicity and aging. *Insect science*, 21: 189-202.
- Knoll, F. (1922). Lichtsinn und blumenbesuch des falters von *Macroglossum stellatarum*. *Abhandlungen der Kaiserlich-königlichen Zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien*, 12: 123-378.
- Kula, E., Martinek, P., Chromcová, L., & Hedbávný, J. (2014). Development of *Lymantria dispar* affected by manganese in food. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 11987-11997.
- Kuperman, R. G., Checkai, R. T., Simini, M., & Phillips, C. T. (2004). Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 48-53.
- Lastra, J. A. S., Barrios, L. E. G., Rojas, J. C., & Rivera, H. P. (2006). Host selection behavior of *Leptophobia aripa* (Lepidoptera: Pieridae). *Florida Entomologist*, 89: 127-134.
- Leisenring, W. & Ryan, L. (1992). Statistical properties of the NOAEL. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*: 15: 161-71.
- Levin, D. & Berube D. (1972) Phlox and Colias: the efficiency of a pollination system. *Evolution*, 26: 241-252.

- Linhart, Y. B. & Mendenhall, J. A. (1977) Pollen dispersal by hawkmoths in a *Lindenia rivalis* population in Belize. *Biotropica*, 9: 142-144.
- Li, G., Sun, G., Ren, Y., Luo, X. & Zhu, Y., (2018). Urban soil and human health: a review. *European Journal of Soil Science*, 69: 196-215.
- Liu, L., Qian, X., Chao, M., Zhao, Y., Huang, J., Wang, T., Sun, F., Ling, E. & Song, H. (2018). Aluminum toxicity related to SOD and expression of presenilin and CREB in *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 99:2.
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52: 231-253.
- López, C., Hernández, J., Cerecedo, M. & Juambelz, I. (2019). Caracterización del suelo en un desarrollo habitacional sobre residuos mineros de Pachuca de Soto, Hidalgo. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 7: 67-75.
- López Jr, J. D., Latheef, M. A., & Hoffmann, W. C. (2010). Effect of emamectin benzoate on mortality, proboscis extension, gustation and reproduction of the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Journal of Insect Science*, 10: 89.
- Lucho, C., Álvarez, M., Beltrán, R., Prieto, F. & Poggi, H. (2005) A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environment International*, 31: 313-323.
- Macdonald, T., Humphreys, W., & Martin, R. (1987). Promotion of tubulin assembly by aluminum ion In vitro. *Science*, 236: 183-186.
- Mancilla-Villa, Ó. R., Ortega-Escobar, H. M., Ramírez-Ayala, C., Uscanga-Mortera, E., Ramos-Bello, R., & Reyes-Ortigoza, A. L. (2012). Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28: 39-48.
- Martens, S. N., & Boyd, R. S. (1994). The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia*, 98: 379-384.

- Martinek, P., Kula, E., & Hedbávný, J. (2018). Reactions of *Melolontha hippocastani* adults to high manganese content in food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148: 37-43.
- Martinek, P., Kula, E., & Hedbávný, J. (2017). Reaction of leaf weevil *Phyllobius arborator* (Coleoptera: Curculionidae) to manganese content in diet. *Environmental Entomology* 46: 131-136.
- Martinek, P., Hedbávný, J., Kudláček, T., Šťasta, M., & Kula, E. (2020). Adverse responses of *Cabera pusaria* caterpillars to high dietary manganese concentration. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(8), 635-643.
- Martin-Olmedo, P., Carroquino, M. J., Ordóñez-Iriarte, J. M & Moya, J. (2016). La evaluación de riesgos en salud, Guía metodológica. Sociedad Española de Sanidad Ambiental.
- Massie, H. R., Williams, T. R., & Aiello, V. R. (1985). Excess dietary aluminum increases *Drosophila*'s rate of aging. *Gerontology*, 31: 309-314.
- Meindl, G. A., & Ashman, T.-L. (2013). The effects of aluminum and nickel in nectar on the foraging behavior of bumblebees. *Environmental Pollution*, 177: 77-81.
- Meindl, G. A., & Ashman, T., (2014). Nickel accumulation by *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae) reduces floral visitation rate. *Journal of Chemical Ecology*, 40: 128-135.
- Menezes, J., Silva, R., Arce, I., & Schneider, I. (2010). Production of a poly-alumino-iron sulphate coagulant by chemical precipitation of a coal mining acid drainage. *Minerals Engineering*, 23: 249-251.
- Menzel, R., Greggers, U. & Hammer, M. (1993). Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honey bee. (D. R. Papaj & A. C. Lewis, eds.), *Insect learning: ecological and evolutionary perspectives*. Chapman and Hall, New York, 79-125.
- Messchendorp, L., Gols, G. J. Z., & Van Loon, J. J. A. (2000). Behavioural observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95: 217-227.
- Mogren, C. L., & Trumble, J. T. (2010). The impacts of metals and metalloids on insect behavior. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 135: 1-17.

- Mohandas, G., Rao, S. V., & Rajini, P. S. (2017). Whey protein isolate enrichment attenuates manganese-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: Relevance to Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95: 1596-1606.
- Monchanin, C., de Brito Sanchez, M. G., Lecouvreur, L., Boidard, O., Méry, G., Silvestre, J., Gaël, L.R., Baque, D., Elger, A., Barron, A.B., Lihoreau, M. & Devaud, J. M. (2022). Honey bees cannot sense harmful concentrations of metal pollutants in food. *Chemosphere*, 297: 134089.
- Moroń, D., Szentgyorgyi, J., Skorka, P., Potts, S.G. & Woyciechowski, M., (2014). Survival, reproduction and population growth of the bee pollinator, *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae), along gradients of heavy metal pollution. *Insect Conservation and Diversity*, 7: 112-124.
- Morgano, M. A., Teixeira Martins, M. C., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Yotsuyanagi, K., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Inorganic contaminants in bee pollen from Southeastern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6876-6883.
- Muñoz-Galicia, D., Castillo-Guevara, C. & Lara, C. (2021). Innate and learnt color preferences in the common green-eyed white butterfly (*Leptophobia aripa*) experimental evidence. *PeerJ* 9: e12567.
- Murphy, D. (1984). Butterflies and their nectar plants: the role of the checkerspot butterfly *Euphydryas editha* as a pollen vector. *Oikos*, 43:113-117.
- Murillo Gomez, J. J., & Giraldo Sánchez, C. E. (2022). Preferencia de oviposición de *Leptophobia aripa* (Lepidoptera: Pieridae) sobre plantas de *Brassica oleracea* var. Italica en diferentes estados fenológicos. *Revis Bionatura*, 8:25.
- Nikolić, M., & Tomašević, V. (2020). Implication of the plant species belonging to the brassicaceae family in the metabolization of heavy metal pollutants in urban settings. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30: 523-534.
- Negri, I., Mavris, C., Di Prisco, G., Caprio, E., & Pellicchia, M. (2015). Honey Bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. *PLoS One*, 10: e0132491.

- Nuzhnova, O. K. & Vasilevskaya, N. V. (2013). The effect of color preferences on the foraging behavior of the green-veined white butterfly (*Pieris napi* L.). *Contemporary Problems of Ecology*, 6: 45-50.
- Pankau, C., & Cooper, R. L. (2022). Molecular physiology of manganese in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 51: 100886.
- Peralta-Videa, J. R., Lopez, M. L., Narayan, M., Saupe, G., & Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41: 1665-1677.
- Pérez-Legaspi, I. A., Garatachia-Vargas, M., García-Villar, A. M., & Rubio-Franchini, I. (2017). Evaluación de la sensibilidad del cladóceros tropical *Ceriodaphnia cornuta* a metales pesados. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 3: 49-56.
- Pérez Jarillo, E. B. (2017). Diversidad de mariposas (Lepidoptera: Rhopalocera) en un gradiente de urbanización en la Zona Metropolitana de Pachuca, Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Pérez-Segovia, A. D. (2018). Evaluación de contaminación de suelo por metales pesados en Pachuca, Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Pettersson, M. W. (1991) Pollination by a guild of luctuating moth populations: option for unspecialization in *Silene vulgaris*. *Journal of Ecology*, 79: 591-604.
- Pollard, A. J., & Baker, A. J. (1997). Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *The New Phytologist*, 135: 655-658.
- Raffa, C. M., Chiampo, F., Shanthakumar, S., 2021. Remediation of metal/metalloid-polluted soils: a short review. *Applied Sciences*, 11: 4134.
- Reich, M. S., Kindra, M., Dargent, F., Hu, L., Flockhart, D. T., Norris, D. R., Kharouba, H., Talavera, G. & Bataille, C. P. (2023). Metals and metal isotopes incorporation in insect wings: Implications for geolocation and pollution exposure. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1085903.

- Reinecke, S., & Reinecke, A. (1997). The influence of lead and manganese on spermatozoa of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 737-742.
- Roane, T & Pepper I. (2000). Microorganisms and metal pollution. (R. M. Maier, I. L. Pepper & C. P. Gerba, eds.), *Environmental Microbiology*. Academic press, London New York.
- Rodrigues, D., & Weiss, M. R. (2012). Reward tracking and memory decay in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae). *Ethology*, 118: 1122-1131.
- Rodrigues, J., Araújo, C., Dos Santos, N., Bandeira, M., Anjos, A., Carvalho, C. & Menezes-Filho, J. A. (2018). Airborne manganese exposure and neurobehavior in school-aged children living near a ferro-manganese alloy plant. *Environmental Research*, 167: 66-77.
- Rokytová, L., Kula, E., Kodarová, L., & Pešlová, A. (2004). Feeding of the willow leaf beetle *Lochmaea capreae* L. (Coleoptera, Chrysomelidae) on leaves of birch (*Betula pendula* Roth) contaminated by heavy metals. *Journal of Forensic Sciences*, 50: 109-117.
- Sánchez López, R. (2004). Protocolo de cría para dos especies de mariposas diurnas *Ascia monuste* (Linnaeus, 1746) y *Leptophobia aripa* (Boisduval, 1836) bajo condiciones controladas en el municipio de La Mesa Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Carrera de Biología. Bogotá. D.C.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A., & Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology* (2nd ed.). Oxford University Press.
- Scott, S. B., Sivakoff, F. S., Meuti, M. E., & Gardiner, M. M. (2023). Metals could challenge pollinator conservation in legacy cities. *Journal of Insect Conservation*, 27: 361-375.
- Sell, D. K., & Bodznick, D. A. (1971). Effects of dietary ZnSO₄ on the growth and feeding of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Annals of the Entomological Society of America*, 64: 850-855.
- Sivakoff, F. & Gardiner, M. (2017). Soil lead contamination decreases bee visit duration at sunflowers. *Urban Ecosystems*, 20: 1221-1228.

- Snell-Rood, E. C., Papaj, D. R., & Gronenberg, W. (2009). Brain size: a global or induced cost of learning? *Brain, Behavior and Evolution*, 73: 111-128.
- Son, J., Lee, Y. S., Lee, S. E., Shin, K. I., & Cho, K. (2017). Bioavailability and toxicity of copper, manganese, and nickel in *Paronychiurus kimi* (Collembola), and biomarker discovery for their exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 142-152.
- Søvik, E., Perry, C., Lamora, A., Barron, A. & Ben-Shahar, Y. (2015). Negative impact of manganese on honeybee foraging. *Biology Letters*, 11: 20140989.
- Stanton, M. L. (1984). Short-term learning and the searching accuracy of egg-laying butterflies. *Animal Behavior*, 32: 33-40.
- Su, H., Wu, J., Zhang, Z., Ye, Z., Chen, Y., & Yang, Y. (2021). Effects of cadmium stress at different concentrations on the reproductive behaviors of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). *Ecotoxicology*, 30: 402-410.
- Takeda, A. (2003). Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews* 41: 79-87.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 133-164.
- Thimmegowda, G. G., Mullen, S., Sottolare, K., Sharma, A., Mohanta, S. S., Brockmann, A., Dhandapany, P.S. & Olsson, S. B. (2020). A field-based quantitative analysis of sublethal effects of air pollution on pollinators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117: 20653-20661.
- Valtierra, M. & Castellanos, I. (2021). Efectos del manganeso en la sobrevivencia y comportamiento alimenticio en *Leptophobia aripa*. *Memorias del VII Foro de proyectos científicos. Área Académica de Biología. Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 264-273.
- Vickerman, D. B., & Trumble, J. T. (1999). Feeding preferences of *Spodoptera exigua* in response to form and concentration of selenium. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 42: 64-73.

- Vickerman, D. B., Young, J. K., & Trumble, J. T. (2002). Effect of selenium-treated alfalfa on development, survival, feeding, and oviposition preferences of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 31: 953-959.
- Waser, N. M. (1986). Flower constancy, definition, cause, and measurement. *The American Naturalist*, 127: 593-603.
- Weast, R. C., & Astle, M. J. (1984). CRC handbook of chemistry and physics, 64 edn. CRC, Boca Raton.
- Weiss, M. R. (2001). Vision and learning in some neglected pollinators. In *Cognitive Ecology of Pollination, Animal Behavior and Floral Evolution*, (Chittka, L. and Thomson, J.D., eds.), Cambridge University Press, 171-190
- Williamson, S. M., & Wright, G. A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216:1799-1807.
- Willmer, P. (2011). *Pollination and floral ecology*. Woodstock, UK. Princeton University Press. 14: 322-336.
- Wills, M. & Savory, J. (1985). Water content of aluminum, dialysis dementia, and osteomalacia. *Environmental Health Perspectives*, 63: 141-147.
- Witters, H., Vangenechten, J. H., Van Puymbroeck, S., & Vanderborght, O. L. (1984). Interference of aluminium and pH on the Na-influx in an aquatic insect *Corixa punctata* (Illig.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 32.
- Yang, Y., Qi, J., Wang, Z., Zhou, Z., Zhao, C., Dong, X., Li, X. & Li, C. (2022). Evaluating the effects of Cu²⁺ on the development and reproduction of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) based on the age-stage, two-sex life table. *Journal of Insect Science*, 22: 4.
- Zeng, J., Guo, J., Shi, J., Shi Z., Zhang, G., Zhang, J. (2021). Stress response of *Lymantria dispar asiatica* (Lepidoptera: Erebidae) larvae and its gut microbiota to manganese ion. *Journal of Forestry Research* 32: 1241-1251.