



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea in chimica

Tesi di Laurea

TITOLO ITALIANO

ENGLISH TITLE

CRISTIAN CALABRÒ

Relatore: *Supervisor's Name Surname*

Correlatore: *Co-Supervisor's Name Surname*

Anno Accademico 202X-202Y

Cristian Calabrò: *Titolo italiano*, Corso di Laurea in chimica, © Anno Accademico 202X-202Y

CONTENTS

List of Figures	3
1 Introduzione	7
1.1 La famiglia Vespidae	7
1.2 Architettura nidi dei vespidi	7
1.3 Polistes	8
1.4 Vespa crabro	8
2 Materiali costitutivi	9
2.1 Materiale fibroso	10
2.1.1 Cellulosa	10
2.2 Materiali proteici	10
3 Metodi di analisi	15
3.1 Preparazione dei campioni	15
3.2 Tecniche di analisi	16
3.3 Risulati e spettri ottenuti	17
4 Numerical results	19
5 Conclusions and Future work	21
Bibliography	23

LIST OF FIGURES

Figure 1	Struttura della proteina predetta con Alphafold . . .	11
Figure 2	Struttura della proteina predetta con Alphafold . . .	12
Figure 3	Struttura della proteina predetta con Alphafold . . .	12
Figure 4	Struttura della proteina predetta con Alphafold . . .	13
Figure 5	Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento	16
Figure 6	Network Security - the sad truth	19

"Insert citation"
— *Insert citation's author*

1

INTRODUZIONE

1.1 LA FAMIGLIA VESPIDAE

La famiglia dei Vespidae rappresenta un gruppo estremamente diversificato di Imenotteri, comprendente più di 5000 specie differenti distribuite tra sei sottofamiglie principali: Stenogastrinae, Eupragiinae, Masarinae, Eumeninae, Polistinae e Vespinae [6].

Tra queste quelle che possono destare più interesse sono specie dei generi *Polistes* e *Vespula*, appartenenti rispettivamente alle sottofamiglie Polistinae e Vespinae; queste vespe hanno la caratteristica di essere specie eusociali [6, 5], ossia vi è una netta idvisisone in caste tra regina, operai e maschi.

Le specie appartenenti a questi generi si prestano in modo ottimale allo studio di diverse proprietà e comportamenti caratteristici, in particolare in questo studio è di interesse il diverso modo di nidificare, i differenti materiali usati durante la nidificazione e la relazione tra i materiali utilizzati e l'ambiente circostante.

1.2 ARCHITETTURA NIDI DEI VESPIDI

Lo studio delle diverse proprietà di nidificazione può essere interessante sotto diversi aspetti, in quanto comprendere le diverse condizioni con cui le vespe costruiscono i propri nidi permette anche di analizzare il loro ruolo ecologico zzz [3].

Ciascuna specie presenta può presentare delle piccole differenze dalle altre a livello di struttura e morfologia dei nidi, dovuti a diversi processi di adattabilità ambientale. Tuttavia è possibile ricondurre a caratteristiche comuni, per esempio vespe sociali tendono a costruire nidi con una architettura più complessa zzz.

1.3 POLISTES

Andando ad osservare nel dettaglio le abitudini di vespe del genere *Polistes* (in particolare *Polistes Dominula* e *Polistes Gallicus*) vedremo che questi vespidi realizzano i propri nidi con un materiale di tipo cartaceo, che viene prodotto tramite l'utilizzo di fibre vegetali, per esempio frammenti di corteccia, che vengono masticati e quindi mescolati con secrezioni salivari di natura proteica; queste hanno lo scopo di legare le fibre vegetali e formare un nido compatto, am anche quello di impermeabilizzare il nido. A livello morfologico queste specie danno origine a nidi zzz *Le Polistes* (es. *P. dominula*, *P. gallicus*) costruiscono nidi aerei aperti, costituiti da un solo favo di celle esagonali sospeso tramite un peduncolo (petiolo) [8]. Questi nidi, privi di involucro esterno, sono realizzati con un materiale di tipo "cartaceo" ottenuto dalla masticazione di fibre vegetali (legno, corteccia o steli secchi) mescolate a secrezioni salivari proteiche che fungono da agente legante e impermeabilizzante [9,10]. La secrezione orale è vitale per la protezione del nido dagli agenti atmosferici. La quantità di saliva è specie-specifica, come dimostrato dalla notevole variazione tra *P. nimpha* (58) e le altre due specie (22-23) [1]

1.4 VESPA CRABRO

Le *Vespula* e le *Vespa* (es. *Vespula vulgaris*, *Vespa crabro*, *Vespa velutina*) costruiscono invece nidi più complessi, generalmente chiusi e multi-strato, composti da diversi favi sovrapposti e protetti da un involucro esterno [11]. Tali nidi possono essere aerei o sotterranei, a seconda della specie, e sono costituiti da una carta più spessa e compatta, con fibre vegetali più corte e una maggiore quantità di materiale inorganico, come polveri e particelle di suolo [12]

2

MATERIALI COSTITUTIVI

La struttura dei nidi dei Vespidi è strettamente legata alla natura dei materiali impiegati nella loro costruzione, i quali variano in composizione chimica, origine e organizzazione molecolare in funzione delle esigenze ecologiche e comportamentali delle specie. I materiali utilizzati derivano principalmente da fonti vegetali o minerali e vengono rielaborati attraverso secrezioni salivari, che ne modificano le proprietà fisiche e meccaniche, consentendo di ottenere un materiale composito di elevata efficienza strutturale.

Dal punto di vista compositivo, la cellulosa costituisce il principale componente dei nidi cartacei. Essa è ottenuta a partire da fibre vegetali masticate e amalgamate con saliva, formando una matrice fibrosa coesa e resistente. Analisi morfologiche e chimiche, condotte mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e spettroscopia a dispersione di energia (EDX), hanno evidenziato come tali strutture siano costituite prevalentemente da carbonio, ossigeno e azoto, con tracce di elementi inorganici quali silicio, calcio e magnesio, derivanti dal substrato ambientale [1]. Le secrezioni orali, ricche di proteine e amminoacidi, svolgono un ruolo adesivo e protettivo, contribuendo alla coesione delle fibre e conferendo al materiale finale proprietà idrofobiche e resistenza agli agenti atmosferici.

Quando il materiale di nidificazione è di origine minerale, come fango o particolato terroso, la composizione risulta dominata da silicati e carbonati di calcio, con un contenuto organico minore ma con una maggiore resistenza meccanica e stabilità strutturale (Khan et al., 2018). Anche la componente cellulosica, laddove presente, può mostrare diversi gradi di ordine molecolare: forme cristalline (cellulosa alfa e beta) e paracristalline coesistono, conferendo al materiale proprietà variabili di flessibilità, densità e capacità di trattenere umidità [7].

2.1 MATERIALE FIBROSO

Le differenti famiglie dei vespidi realizzano i propri nidi con una ampia varietà di materiali fibrosi [3]. Tra questi materiali alcuni dei più utilizzati sono fibre di origine vegetale quali legno alterato o sano, cellule cuticolari fogliari e peli fogliari [4], oltre a segatura, tricomi, epidermide fogliare, alghe e polline [3]. Per quanto riguarda le specie appartenenti al genere *Polistes* abbiamo principalmente fibre derivanti dal legno esposto ad agenti atmosferici, ossia fibre vegetali lunghe e peli vegetali. La scelta di queste fibre influenza poi ovviamente le proprietà del nido realizzato, altri fattori da tenere in considerazione sono anche il sito di nidificazione e soprattutto il diverso tempo di masticazione dei materiali prima di essere incorporati nel nido. [2]

Esistono anche alcune specie particolari, come *Vespula vulgaris* oppure come *Vespa crabro*, che realizzano in modo differente l'involucro esterno del nido e le celle interne dove quindi si hanno differenze nelle proprietà dei materiali fibrosi utilizzati. Specie come appunto *Vespula vulgaris*, ma anche altre quali *Dolichovespula sylvestris* e *Dolichovespula norwegica*, si può osservare che le fibre presenti nelle celle interne risultano essere significativamente più corte di quelle utilizzate per l'involucro esterno. Tali differenze nella lunghezza delle fibre possono derivare o dalla selezione di diverse fonti di polpa o da una differente intensità del processo di masticazione.

Ad esempio, *Vespula vulgaris* utilizza frammenti corti ("short chunks") di materiale legnoso e può raccogliere rapidamente blocchi di legno marcio, risultando in una carta di qualità inferiore ma con un risparmio di tempo nella raccolta rispetto alle specie che utilizzano fibre sane, come le *Dolichovespula* (che impiegano fibre lunghe e sottili). La lunghezza e la composizione delle fibre sono direttamente correlate alla resistenza della carta

2.1.1 *Cellulosa*

2.2 MATERIALI PROTEICI

I materiali proteici presenti nei nidi dei vespidi sociali derivano prevalentemente da una secrezione orale (saliva), che funge da legante o adesivo per le fibre vegetali. Questa secrezione è descritta come una proteina simil-seta (silklike protein) o mucoproteina, e viene aggiunta alla polpa di cellulosa durante il processo di costruzione. Chimicamente, questa

secrezione si indurisce rapidamente e irreversibilmente in una sostanza cornea insolubile e idrorepellente, essenziale per l'impermeabilizzazione e il rafforzamento del nido. L'analisi degli aminoacidi della proteina di nido in *Polistes metricus* ha mostrato un'alta concentrazione di glicina, serina, alanina e prolina (che insieme costituiscono il 65-73 percento dei residui identificati). In particolare, la presenza relativamente elevata di prolina (10.6-12.5 percento nei nidi di *P. metricus*) è significativa, in quanto contribuisce alla resistenza strutturale del nido, essendo un aminoacido dominante nelle proteine strutturali. Nel contesto specifico di *Polistes dominula*, l'allocazione di materiale proteico alla costruzione del nido è stata studiata come un compromesso (trade-off) tra la robustezza del nido e la produttività della prole. Nello specifico, in condizioni di foraggiamento naturale (scarsità di prede), *P. dominula* utilizzava una concentrazione proteica significativamente inferiore nel materiale del nido rispetto a *Polistes fuscatus*. Questo suggerisce che *P. dominula* (specie invasiva) può allocare meno proteine per la secrezione orale, destinandone di più alla prole in via di sviluppo, il che contribuisce a una maggiore produttività in condizioni di risorse limitate. Le specie di *Polistes* come *P. gallicus* e *P. dominula*, oltre alla secrezione orale per l'incollaggio della carta, utilizzano anche una secrezione ghiandolare sternale sul peduncolo del nido come deterrente chimico contro i predatori, in particolare le formiche. Questa secrezione repulsiva è composta principalmente da lipidi e acidi grassi liberi (come l'acido esadecanoico e l'acido ottadecenoico, rilevati nel peduncolo di *P. annularis* e nelle ghiandole sternali di *P. fuscatus* e *P. annularis*), che pur non essendo proteine, sono cruciali per la difesa chimica.

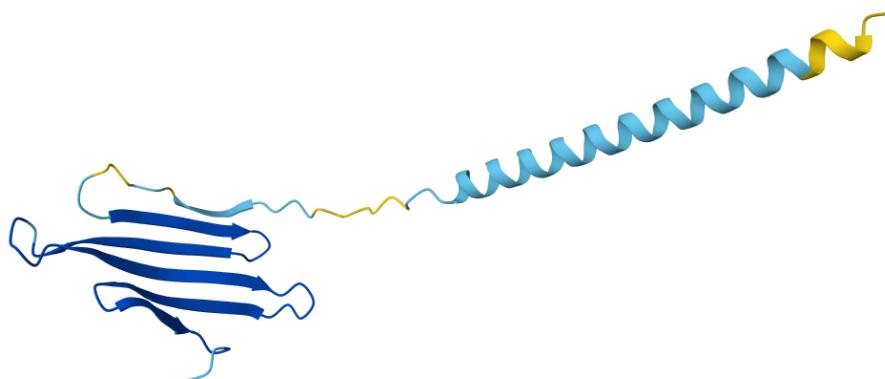


Figure 1: Struttura della proteina predetta con AlphaFold



Figure 2: Struttura della proteina predetta con Alphafold

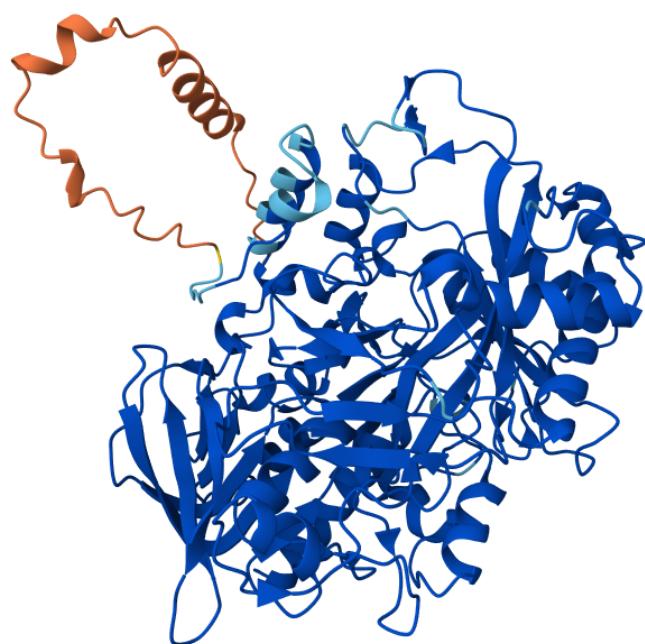


Figure 3: Struttura della proteina predetta con Alphafold



Figure 4: Struttura della proteina predetta con AlphaFold

3

METODI DI ANALISI

Lo scopo principale delle attività sperimentali è stato quello di determinare la composizione e struttura dei nidi di diverse specie appartenenti alla famiglia vespidae. Sono stati analizzati campioni provenienti da nidi di *Polistes dominula*, *Polistes gallicus*, *Vespula* spp. e *Vespa crabro*, di questi ultimi si è analizzato sia l'involucro esterno sia le celle interne dei nidi.

Per preservare le caratteristiche dei campioni dei nidi, e quindi evitare trattamenti preliminare di qualsiasi natura, si è proceduto all'analisi di questi tramite la tecnica di spettroscopia NMR a stato solido, che permette di ricavare importanti informazioni riguardo la struttura e l'organizzazione delle componeneti dei nidi.

Le analisi sono state condotte due diversi spettrometri che lavorano con intensità di campo differente, 700 e 800; nel presente capitolo si descrive la procedura di preparazione del campione, le diverse analisi effettuate sui campioni e la raccolta dei dati sperimentali.

3.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni dei nidi che sono stati utilizzati sono:

- *Polistes dominula*
- *Polistes gallicus*
- *Vespa crabro* - celle interne e involucro esterno
- *Vespula* - celle interne e involucro esterno

Il vantaggio della tecnica utilizzata è quello di poter usare il campione desiderato tale e quale allo stato solido, ossia senza bisogno di trattamenti chimici o di trovare un solvente adeguato per preparare una soluzione da analizzare. L'unica necessità preparativa è quella di ottenere il campione

finemente macinato, quindi i diversi campioni sono stati tutti triturati con un pestello in un mortaio fino a raggiungere una polvere fine e omogenea; è infatti importante per la qualità dei risultati che le dimensioni dei granuli che si ottengono siano il più possibile simili.

Dopo questa breve preparazione i campioni sono stati introdotti con un apposito imbuto in un rotore di 3.2 mm, questo è stato poi compattato il più possibile in modo che all'interno ci fosse più campione possibile. Una volta preparato correttamente il rotore questo è stato chiuso ed è stato fatto un segno con un pennarello in modo che lo spettrometro tramite un sensore IR rilevasse la velocità di rotazione del rotore durante l'analisi.

3.2 TECNICHE DI ANALISI

Per andare a studiare la struttura molecolare dei nidi si è sfruttata la tecnica di spettroscopia NMR allo stato solido del carbonio-13 (^{13}C CP/MAS NMR), che consente di ricavare informazioni sulla struttura tramite il segnale associato al ^{13}C . Essa combina la polarizzazione incrociata (Cross Polarization, CP), che aumenta la sensibilità del segnale ^{13}C trasferendo magnetizzazione dai nuclei di ^1H , con la rotazione ad angolo magico (Magic Angle Spinning, MAS), che riduce l'anisotropia delle interazioni dipolari e dello spostamento chimico. Questa configurazione permette di ottenere spettri ad alta risoluzione, utili per distinguere le diverse tipologie di carbonio presenti e valutare il grado di ordine o disordine strutturale del materiale analizzato, in questo caso i nidi delle specie della famiglia vespidae

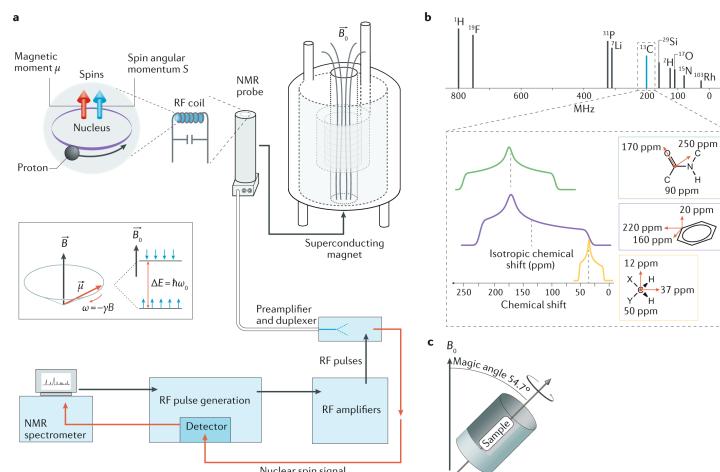


Figure 5: Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento

Per i diversi campioni sono state effettuate misure con due differenti spettrometri che lavorano ad una diversa intensità del campo magnetico, ossia 700 MHZ (che corrisponde ad un campo magnetico di 16.4 T) e 800 MHz (che corrisponde ad un campo magnetico di 18.8 T). In particolare sono stati analizzati con lo strumento a 700 MHz i campioni di:

- *Polistes dominula*
- *Polistes gallicus*
- *Vespa crabro* - celle interne e involucro esterno

Mentre con lo strumento a 800 MHz sono stati analizzati i campioni di:

- *Polistes dominula*
- *Vespa crabro* - celle interne e involucro esterno
- *Vespula* - celle interne e involucro esterno

Le analisi effettuate con lo spettrometro a 800 MHz consente di ottenere una maggiore sensibilità e una migliore risoluzione spettrale. Il campione di *Vespa crabro* è stato analizzato con entrambi gli strumenti in quanto gli spettri ottenuti con lo spettrometro a 700 MHz sono stati esclusi dall'analisi a causa di problemi tecnici riscontrati nel funzionamento del probe durante la misura. Invece per i nidi di *Polistes dominula* sono stati registrati gli spettri di entrambi gli spettrometri poiché si voleva un confronto tra i due spettri ottenuti e soprattutto un confronto riguardante i chemical shift dei carboni in posizione 1 e posizione 4 presenti in letteratura [7] che sono stati determinati proprio con uno strumento a 700 MHz.

3.3 RISULTATI E SPETTRI OTTENUTI

4

NUMERICAL RESULTS

This is where you show that the novel ‘thing’ you described in Chapter 3 is, indeed, much better than the existing versions of the same.

You will probably use figures (try to use a high-resolution version), graphs, tables, and so on. An example is shown in Figure 6.

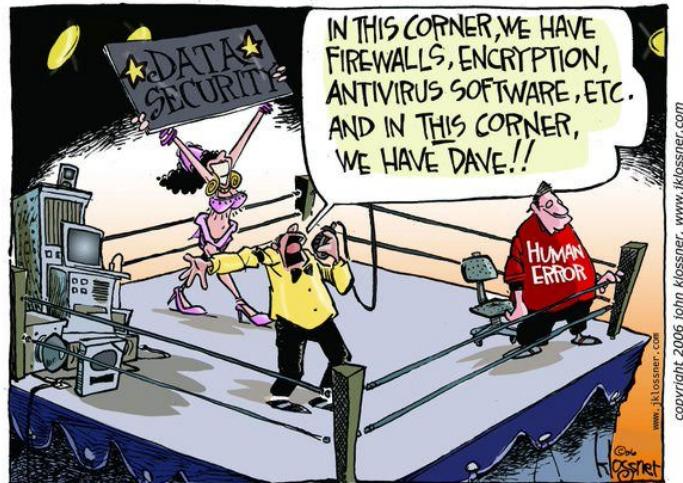


Figure 6: Network Security - the sad truth

Note that, likewise tables and listings, you shall not worry about where the figures are placed. Moreover, you should not add the file extension (LaTeX will pick the ‘best’ one for you) or the figure path.

5

CONCLUSIONS AND FUTURE WORK

They say that the conclusions are the shortened version of the introduction, and while the Introduction uses future verbs (we will), the conclusions use the past verbs (we did). It is basically true.

In the conclusions, you might also mention the shortcomings of the present work and outline what are the likely, necessary, extension of it. E.g., we did analyse the performance of this network assuming that all the users are pedestrians, but it would be interesting to include in the study also the ones using bicycles or skateboards.

Finally, you are strongly encouraged to carefully spell check your text, also using automatic tools (like, e.g., Grammarly¹ for English language).

¹ <https://www.grammarly.com/>

BIBLIOGRAPHY

- [1] Nil Bağrıaçık. Comparison of the nest materials of *polistes gallicus* (l.), *polistes dominulus* (christ) and *polistes nimpha* (christ) (hymenoptera: Vespidae). *Archives of Biological Sciences*, 64:1079–1084, 01 2012.
- [2] Nil Bağrıaçık. Some structural features of nest materials of *Polistes nimpha* (christ, 1791) in several ecological conditions (hymenoptera: Vespidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 15:1–7, 2013.
- [3] Rafael Borges, Sherlem Felizardo, J Santos, and Orlando Silveira. Nest building by a neotropical social wasp using cecropia trichomes as main construction material (hymenoptera, vespidae, polistinae). *Insectes Sociaux*, 64, 04 2017.
- [4] M. R. Cole, M. H. Hansell, and C. J. Seath. A quantitative study of the physical properties of nest paper in three species of vespine wasps (hymenoptera, vespidae). *Insectes Sociaux*, 48(1):33–39, 2001.
- [5] Henri Goulet and John Huber. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. 01 1993.
- [6] Khalid Khan, Muhammad Rasool, Muhammad Zahid, Muhammad Ismail, Qadeem Khan, Sahibzada Muhammad Jawad, Riaz Ahmad, Mujeeb Ullah, Muhammad Sajid, and Ikram Ullah. Chemical composition, structure and architecture of the nest of various species of vespidae (insecta: Hymenoptera). *Jokull*, 68, 03 2018.
- [7] Per Tomas Larsson, Kristina Wickholm, and Tommy Iversen. A cp/mas13c nmr investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydrate Research*, 302(1):19–25, 1997.