



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

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

Tesi di Laurea

**ANALISI STRUTTURALE E COMPOSIZIONE
CHIMICA DEI NIDI DI DIVERSE SPECIE DI
VESPIDAE MEDIANTE SPETTROSCOPIA NMR
ALLO STATO SOLIDO**

**STRUCTURAL ANALYSIS AND CHEMICAL
COMPOSITION OF NESTS OF VARIOUS
VESPIDAE SPECIES USING SOLID-STATE
NMR SPECTROSCOPY.**

CRISTIAN CALABRÒ

Relatore: *Enrico Ravera*

Correlatore: *Co-Supervisor's Name Surname*

Anno Accademico 2025-2026

Cristian Calabrò: *Analisi strutturale e composizione chimica dei nidi di diverse specie di Vespidae mediante spettroscopia NMR allo stato solido*, Corso di Laurea in chimica, © Anno Accademico 2025-2026

CONTENTS

List of Figures	3
1 Introduzione	9
1.1 La famiglia Vespidae	9
1.2 Genere Polistes	10
1.3 Genere Vespa e Vespula	11
1.4 Materiale	12
1.5 Materiale fibroso	13
1.5.1 Cellulosa	14
1.6 Materiali proteici	14
2 Metodi di analisi	19
2.1 Preparazione dei campioni	19
2.2 Tecniche di analisi	20
2.3 Risultati e spettri ottenuti	22
2.3.1 Spettri monodimensionali	22
2.3.2 Spettri bidimensionali	26
3 Risultati ed elaborazione dati	31
3.1 Struttura proteica	31
3.2 Processing spettri e assegnazione dei segnali	34
3.2.1 Polistes dominula	36
3.2.2 Polistes gallicus	39
3.2.3 Vespa crabro	41
3.2.4 Vespula vulgaris	43
3.3 Analisi del segnale proteico	45
4 Conclusions and Future work	49
Bibliography	51

LIST OF FIGURES

Figure 1	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-03231.1 predetta con Alphafold	16
Figure 2	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-08705.1 predetta con Alphafold	16
Figure 3	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-10508.1 predetta con Alphafold	17
Figure 4	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-04156.1 predetta con Alphafold	17
Figure 5	Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento	20
Figure 6	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vec- chio di Polistes dominula (700MHz)	22
Figure 7	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vec- chio di Polistes dominula (800MHz)	22
Figure 8	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di Polistes dominula (800MHz)	23
Figure 9	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vec- chio Polistes gallicus (700MHz)	23
Figure 10	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di Polistes gallicus (700MHz)	24
Figure 11	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR delle celle di Vespa crabro (800MHz)	24
Figure 12	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di Vespa crabro (800MHz)	25
Figure 13	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR delle celle di Vespula vulgaris (800MHz)	25
Figure 14	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di Vespula vulgaris (800MHz)	26
Figure 15	Spettro bidimensionale Polistes dominula	26
Figure 16	Prima traccia del segnale del protone	27
Figure 17	Seconda traccia del segnale del protone Polistes dominula	27
Figure 18	Spettro bidimensionale Polistes gallicus	28
Figure 19	Prima traccia del segnale del protone Polistes gallicus	28

4 LIST OF FIGURES

Figure 20	Seconda traccia del segnale del protone <i>Polistes gallicus</i>	29
Figure 21	Spettro bidimensionale <i>Vespula vulgaris</i>	29
Figure 22	Prima traccia del segnale del protone <i>Vespula vulgaris</i>	30
Figure 23	Seconda traccia del segnale del protone <i>Vespula vulgaris</i>	30
Figure 24	Struttura della proteina 03231 eliminando la porzione ad alfa elica	32
Figure 25	Struttura della proteina 08705 eliminando la porzione ad alfa elica	32
Figure 26	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalle superficie azzurre attorno alla proteina 10508	33
Figure 27	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 04156	33
Figure 28	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 08705	34
Figure 29	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 03231	34
Figure 30	Fit zona C1	36
Figure 31	Fit zona C1	37
Figure 32	Fit zona C1	37
Figure 33	Fit zona C4	38
Figure 34	Fit zona C4	38
Figure 35	Fit zona C4	39
Figure 36	Fit zona C1	39
Figure 37	Fit zona C1	40
Figure 38	Fit zona C4	40
Figure 39	Fit zona C4	41
Figure 40	Fit zona C1	41
Figure 41	Fit zona C1	42
Figure 42	Fit zona C4	42
Figure 43	Fit zona C4	43
Figure 44	Fit zona C4	43
Figure 45	Fit zona C4	44
Figure 46	Fit zona C4	44

Figure 47	Fit zona C4	45
Figure 48	Predizione del segnale proteico sullo spettro di <i>Polistes dominula</i>	46
Figure 49	Contribuzione del segnale da parte delle differenti strutture secondarie	46

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

INTRODUZIONE

Le vespe appartenenti alla famiglia Vespidae rappresentano un gruppo di insetti sociali di notevole interesse sia ecologico che chimico-biologico, grazie alla complessità dei materiali che impiegano nella costruzione dei propri nidi [5, 9]. Questi materiali, derivati principalmente da fonti vegetali, come le fibre di legno, e da secrezioni di origine animale, come la saliva (secrezioni orali proteiche), costituiscono biocompositi naturali nei quali componenti cellulosiche e proteiche interagiscono conferendo al nido specifiche proprietà meccaniche, strutturali e di resistenza ambientale, inclusa l'impermeabilizzazione [6, 14]. Lo studio della composizione chimica e strutturale dei nidi consente di comprendere non solo le strategie costruttive e adattative delle diverse specie di vespe, ma anche di individuare analogie con materiali polimerici naturali di potenziale interesse per la scienza dei materiali, fungendo da ispirazione per nuove soluzioni tecnologiche.

In questa tesi si analizzano nidi di diverse specie appartenenti alla famiglia Vespidae, con particolare attenzione alla componente cellulosica e proteica, mediante tecniche di spettroscopia NMR allo stato solido e altre analisi complementari. L'obiettivo è quello di correlare la composizione chimica dei nidi con le differenti modalità costruttive e ambientali delle specie considerate, contribuendo alla comprensione dei processi biochimici e strutturali alla base della formazione di questi peculiari biocompositi naturali.

1.1 LA FAMIGLIA VESPIDAE

La famiglia Vespidae rappresenta un gruppo estremamente diversificato di Imenotteri, con una vasta gamma di abitudini sociali e morfologiche, ed è distribuita in diverse sottofamiglie, tra cui le eusociali Polistinae e Vespinae. [9] Le specie eusociali si caratterizzano per una distinta divisione in caste (regina, operai e maschi), tuttavia si osservano comunque

profonde differenze riguardo le strategie adottate per la nidificazione e nella diversa adattabilità ambientale. [9]

L'architettura del nido è un tratto evolutivo cruciale, plasmato da fattori ambientali e dalla forte pressione predatoria, in particolare da parte delle formiche, nelle regioni tropicali. [9] Si possono distinguere due principali strategie architettoniche, specie del genere *Polistes* per esempio realizzano nidi con favo scoperto sospesi tramite un sottile peduncolo difeso chimicamente con una secrezione ghiandolare repellente, questa tipologie di nidi sono detti stelocittari gimnodomi. [9] L'altra tipologia è rappresentata dai nidi caliptomi tipico dei generi *Vespa* e *Vespa*, sono nidi caratterizzati da un favo racchiuso in un involucro dove l'accesso è rappresentato da un'unica fessura o foro, nidi di questo tipo facilitando la difesa e forniscono anche isolamento termico. [9, 5, 13] Il materiale primario di costruzione è il cartone, che si origina dalla miscelazione di fibre vegetali (cellulose), talvolta legno alterato o triconi specifici, che ne influenzano la resistenza e la densità, con una secrezione orale proteica ricca di aminoacidi come prolina, glicina e serina, che funge da matrice adesiva, conferendo robustezza e idrorepellenza. [9] Infine, l'organizzazione comportamentale all'interno della colonia è complessa e dinamica, implicando una ripartizione dei compiti (foraggiatori d'acqua e polpa, costruttori), con la regolazione di tale ripartizione che emerge dalla disponibilità di risorse idriche temporaneamente immagazzinate nell'ingluvie delle operaie, un meccanismo noto come "stomaco comune" che funge da centro di informazione omeostatico per bilanciare le esigenze di costruzione e metaboliche della colonia. [9]

1.2 GENERE 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]

1.3 GENERE VESPA E VESPULA

Le specie appartenenti al genere Vespa e *Vespula* sono vespidi sociali che si sono adattati prevalentemente alle regioni temperate. [9] Si hanno caratteristiche in comune riguardo la struttura dei nidi realizzati dalle differenti specie di questi generi, tra cui la differenziazione della struttura delle celle interne e dell'involucro esterno. [5] Questi nidi sono realizzati con un caratteristico sistema di favi multipli impilati verticalmente uno sotto l'altro e poi avvolti dall'involucro esterno. [9] L'involucro è realizzato in modo da fornire protezione alle celle e al nido nel complesso, garantendo isolamento termico e protezione dagli agenti atmosferici [5], Il nido è costruito a partire dal cartone, materiale leggero ottenuto dalla masticazione di fibre vegetali mescolate con una secrezione orale. [9] I nidi della specie *Vespa crabro* presentano queste esatte caratteristiche e hanno generalmente una forma ovoidale con dimensioni piuttosto discrete se confrontati con nidi di altre specie.[13]

Mentre per la specie *Vespula vulgaris* si osserva che la carta che componete i favi risulta essere più sottile rispetto alla carta dell'involucro. [5] Inoltre una proprietà che differisce tra *Vespula vulgaris* e altre *Vespinae* (come *Dolichovespula sylvestris* e *Dolichovespula norwegica*) è che la densità della carta usata per realizzare i favi è inferiore rispetto a quella della carta usata per l'involucro. [5] I favi sono strutturalmente complessi, funzionando come una trave o una mensola che supporta il proprio peso e quello della covata; tuttavia, la loro carta può essere più sottile, rispetto alla struttura esterna, in quanto beneficiano di rinforzi secondari. [5] L'involucro esterno, non avendo questi supporti secondari, deve essere più spesso per svolgere efficacemente le sue funzioni di impermeabilità, difesa e isolamento termico. [5]

Le differenze nelle proprietà fisiche della carta sono correlate al sito di nidificazione tipico di ciascuna specie. [5] I nidi dei *Vespinae* sono generalmente costruiti all'interno di un involucro in quanto, a differenza di molti generi tropicali, i *Vespinae* non presentano prove dell'utilizzo di un repellente chimico efficace contro i predatori come le formiche. [9] Di conseguenza, l'involucro aiuta a limitare l'accesso alla covata

a una stretta apertura, che può essere difesa attivamente dalle vespe "guardiane". [9] *Vespula vulgaris* è un esempio di specie nidificante in cavità che sceglie di nidificare quasi esclusivamente in cavità o in siti sotterranei. [5] Data questa scelta di siti protetti, l'involucro del nido è meno esposto agli agenti atmosferici. [5] La carta prodotta da *V. vulgaris* è stata qualificata come fragile e la sua minore resistenza strutturale è in linea con l'habitat protetto in cui nidifica, suggerendo che la velocità di costruzione potrebbe essere più cruciale della qualità del materiale. [5] Al contrario, le specie che nidificano in siti esposti o semi-aperti, come le *Dolichovespula*, necessitano di un involucro più robusto e una maggiore resistenza alla trazione, specialmente nella direzione delle bande di polpa. [5] Le colonie di *V. vulgaris* sono tipicamente grandi. *Vespa crabro*, sebbene sia la più grande delle *Vespinae* temperate, costruisce nidi che possono essere ospitati in cavità di alberi o altri luoghi riparati. [13]

1.4 MATERIALE

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 cellulosa, 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 [11].

1.5 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 [5], 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

1.5.1 *Cellulosa*

I nidi costruiti dalle specie appartenenti alla famiglia Vespidae, noti per la loro struttura cartacea, si basano fondamentalmente sulla cellulosa come costituente primario della componente fibrosa. Questo materiale, tipicamente derivato da fibre vegetali, spesso legno alterato o marcescente, viene processato e aggregato dalle vespe con l'ausilio di una secrezione orale proteica, la quale agisce da legante, rafforzando la struttura e contribuendo alla sua resistenza meccanica. La cellulosa, in quanto principale composto organico dell'involucro del nido, è cruciale per le proprietà fisiche del materiale, fornendo un'elevata resistenza alla trazione e un basso peso specifico. A livello ultrastretturale e chimico, la cellulosa presente in queste strutture manifesta una complessa architettura molecolare. L'analisi mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare del carbonio (^{13}C NMR) con polarizzazione incrociata e rotazione all'angolo magico (CP/MAS ^{13}C NMR) ha permesso di elucidare il polimorfismo strutturale di questo biopolimero. I domini cristallini della cellulosa nativa, che costituisce la base della fibra vegetale impiegata, sono composti da una miscela di due allomorfi distinti: la cellulosa Ialfa e la cellulosa Ibeta. Sebbene la cellulosa Ibeta sia la forma predominante nelle piante superiori, studi approfonditi hanno rivelato la presenza diffusa di segnali spettrali aggiuntivi, non direttamente riconducibili agli allomorfi cristallini Ialfa e Ibeta. Nello specifico, la quantificazione spettrale ha identificato un segnale caratteristico nell'intervallo C-4 (88.1-88.5) e C-1 (104.5). Questa componente, rilevata in diverse fonti di cellulosa nativa, inclusa la cellulosa di legno, è stata attribuita a una struttura 'in core' meno ordinata o para-cristallina. Tale isoforma manifesta una mobilità molecolare superiore rispetto agli allomorfi cristallini Ia α e Ibeta, suggerendo che l'architettura fibrosa dei nidi delle Vespidi incorpora stati di ordine della cellulosa più eterogenei e complessi rispetto alla semplice dicotomia tra domini amorfi e cristallini convenzionali.

1.6 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 [13]. 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 [14, 7]. Chemicamente, questa secrezione si indurisce rapidamente e irreversibilmente in una sostanza

cornea insolubile e idrorepellente, essenziale per l'impermeabilizzazione e il rafforzamento del nido [13, 6]. L'analisi degli amminoacidi 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) [14]. 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 amminoacido dominante nelle proteine strutturali [14]. 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.

Studi condotti sui nidi della specie *Polistes dominula* hanno permesso di individuare un gruppo di proteine con la probabile funzione di impermeabilizzare il nido [15]. Partendo poi da questo studio si è andato a ricercare la sequenza aminoacidica relativa, dalla quale è stata predetta la struttura tridimensionale usando Alphafold [10].

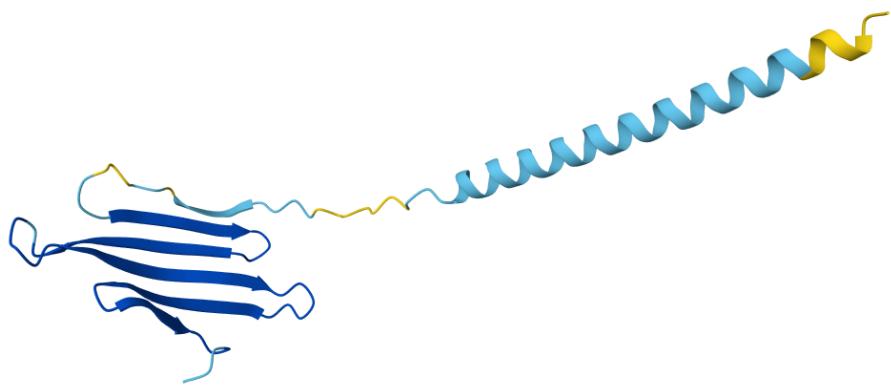


Figure 1: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-03231.1 predetta con AlphaFold



Figure 2: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-08705.1 predetta con AlphaFold

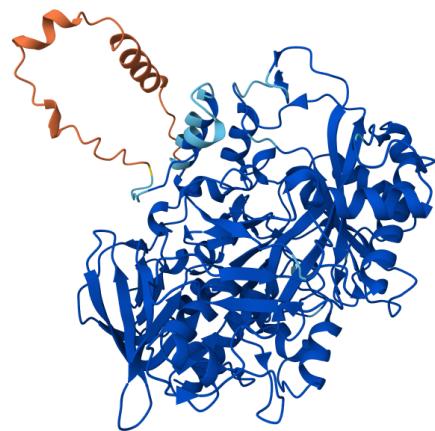


Figure 3: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-10508.1 predetta con AlphaFold



Figure 4: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-04156.1 predetta con AlphaFold

Sono state riportate le strutture di quattro delle proteine:

- PdomMRNAr1.2-03231.1
- PdomMRNAr1.2-08705.1
- PdomMRNAr1.2-10508.1

- PdomMRNAr1.2-04156.1

Le strutture di queste proteine sono state predette con successo, ciò è dimostrato dalle sequenze di colore blu e azzurro nelle immagini precedenti. L'unica incertezza, mostrata nella predizione con un colore arancione della catena, è associata ad una porzione della proteina PdomMRNAr1.2-04156.1.

Altre due proteine erano stato individuate, tuttavia per una di queste non era stato possibile determinare la sequenza aminoacidica, mentre per l'altra non si è riusciti ad ottenere una predizione della struttura soddisfacente.

2

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.

2.1 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.

2.2 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

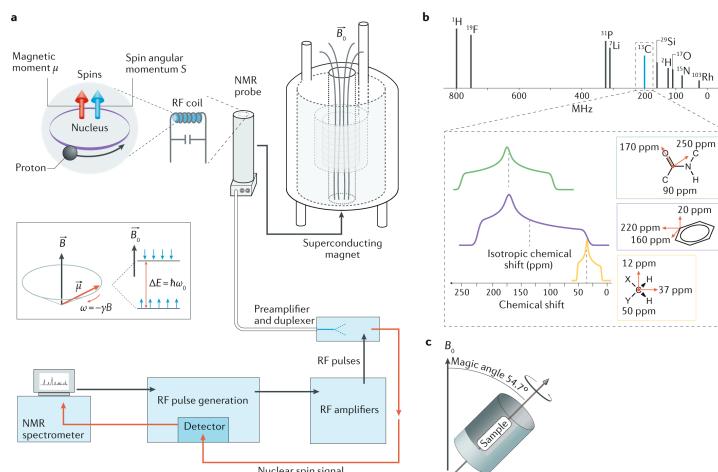


Figure 5: Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento

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 [11] che sono stati determinati proprio con uno strumento a 700 MHz.

2.3 RISULTATI E SPETTRI OTTENUTI

2.3.1 Spettri monodimensionali

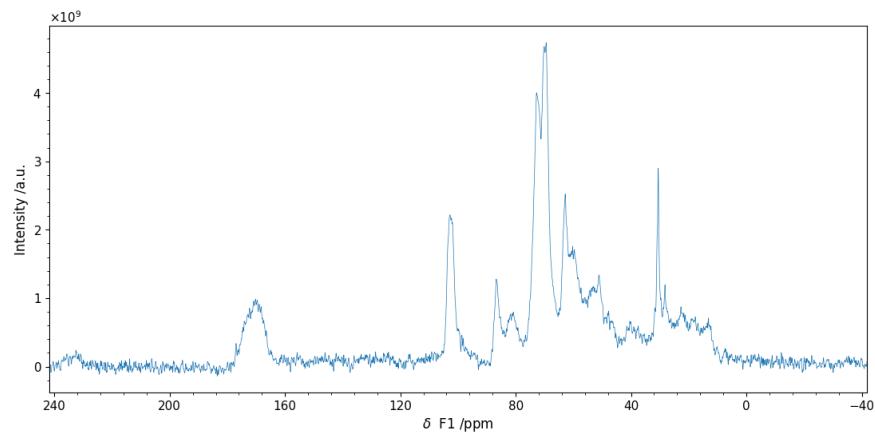


Figure 6: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vecchio di *Polistes dominula* (700MHz)

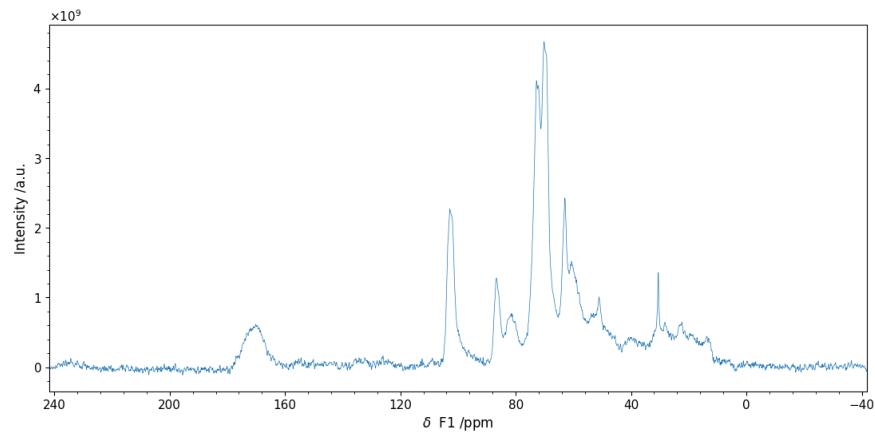


Figure 7: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vecchio di *Polistes dominula* (800MHz)

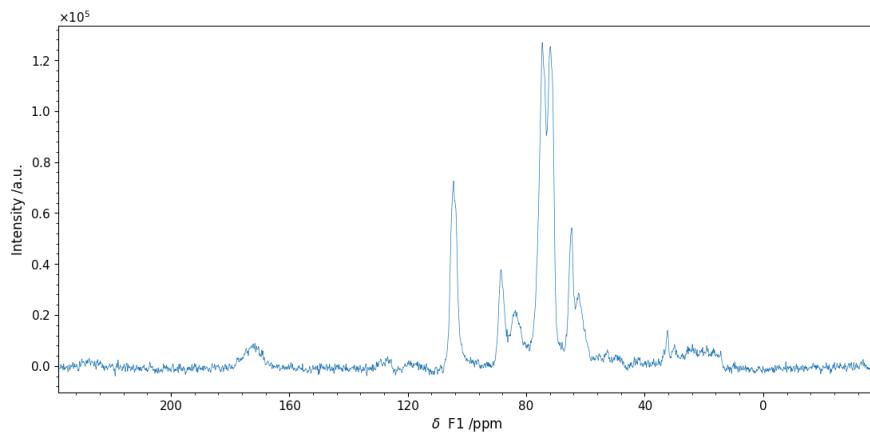


Figure 8: Spettro ¹³C CP/MAS NMR del campione più nuovo di *Polistes dominula* (800MHz)

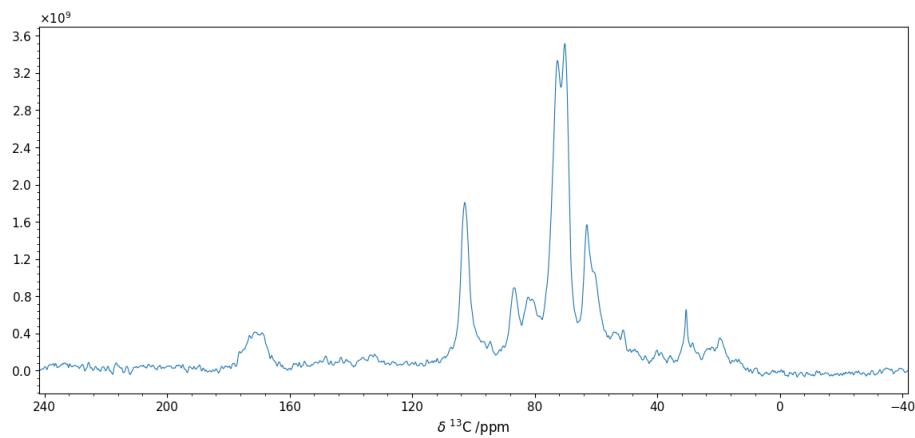


Figure 9: Spettro ¹³C CP/MAS NMR del campione più vecchio *Polistes gallicus* (700MHz)

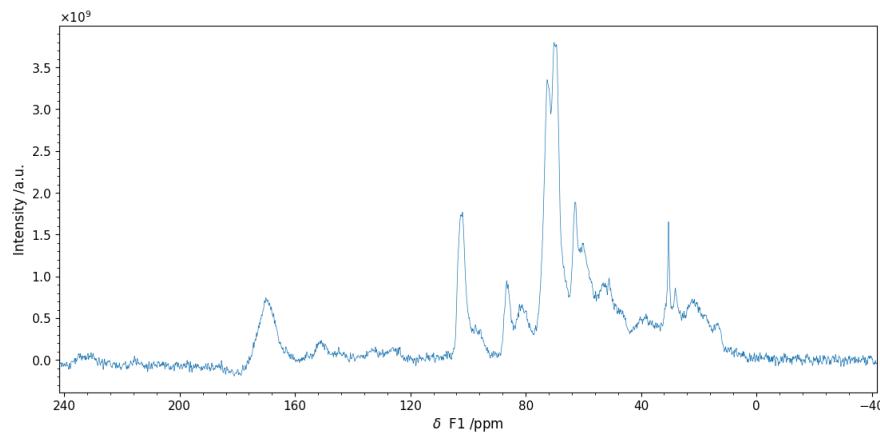


Figure 10: Spettro ¹³C CP/MAS NMR del campione più nuovo di *Polistes gallicus* (700MHz)

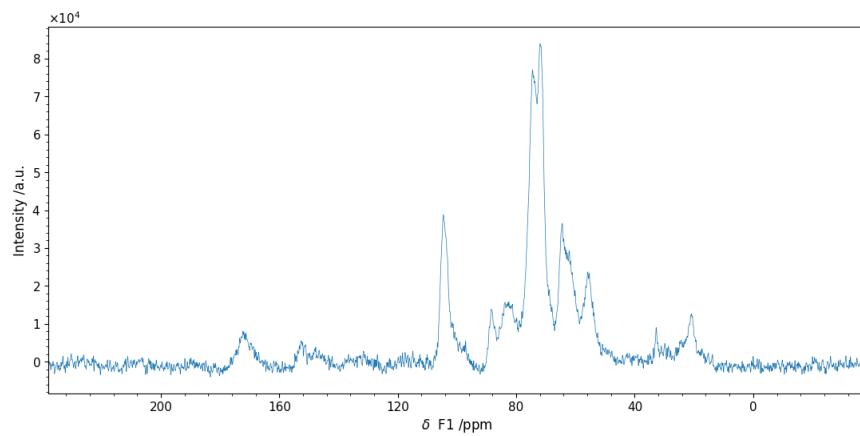


Figure 11: Spettro ¹³C CP/MAS NMR delle celle di *Vespa crabro* (800MHz)

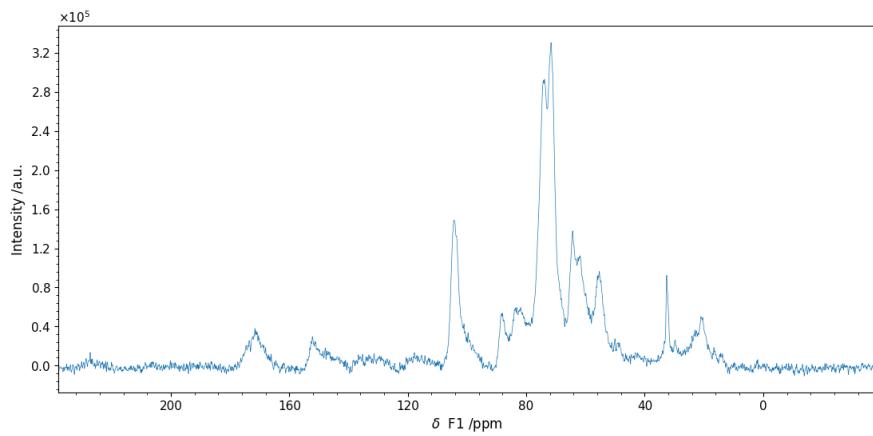


Figure 12: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di Vespa crabro (800MHz)

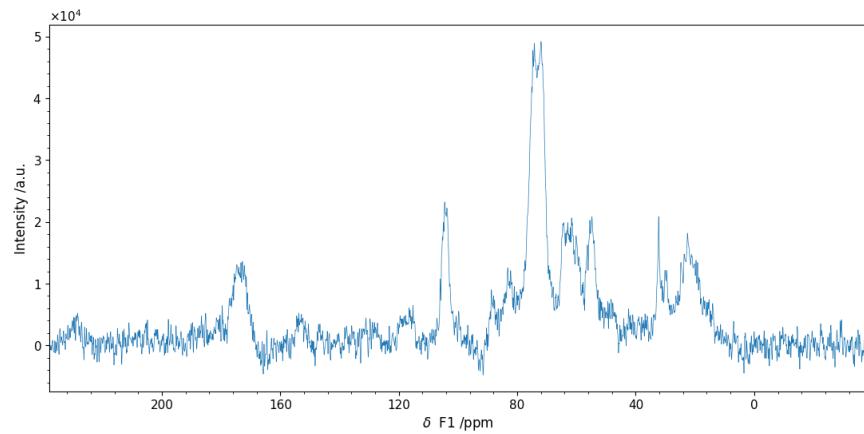


Figure 13: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR delle celle di *Vespula vulgaris* (800MHz)

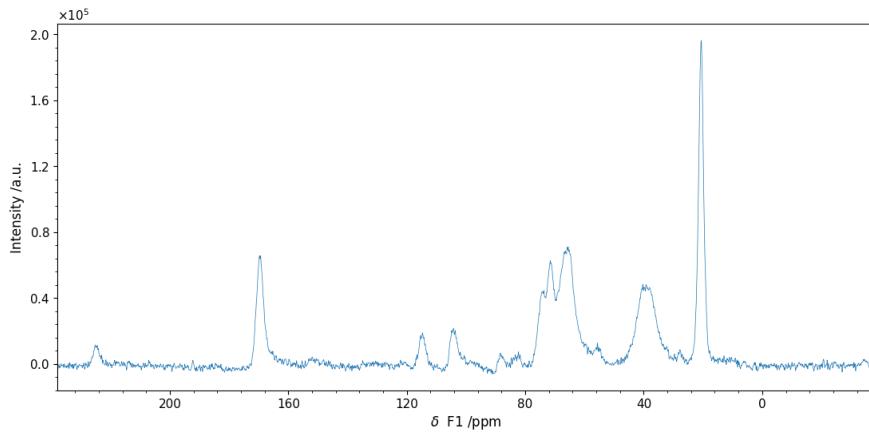


Figure 14: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di *Vespa vulgaris* (800MHz)

2.3.2 Spettri bidimensionali

Sono riportati gli spettri bidimensionali di *Polistes dominula*, *Polistes gallicus* e *Vespa vulgaris*; in questi sono state evidenziate tre differenti zone: in rosso la zona relativa al segnale del gruppo carbonilico delle proteine, in blu la zona relativa al segnale della cellulosa e in giallo la zona relativa all'altro segnale proteico.

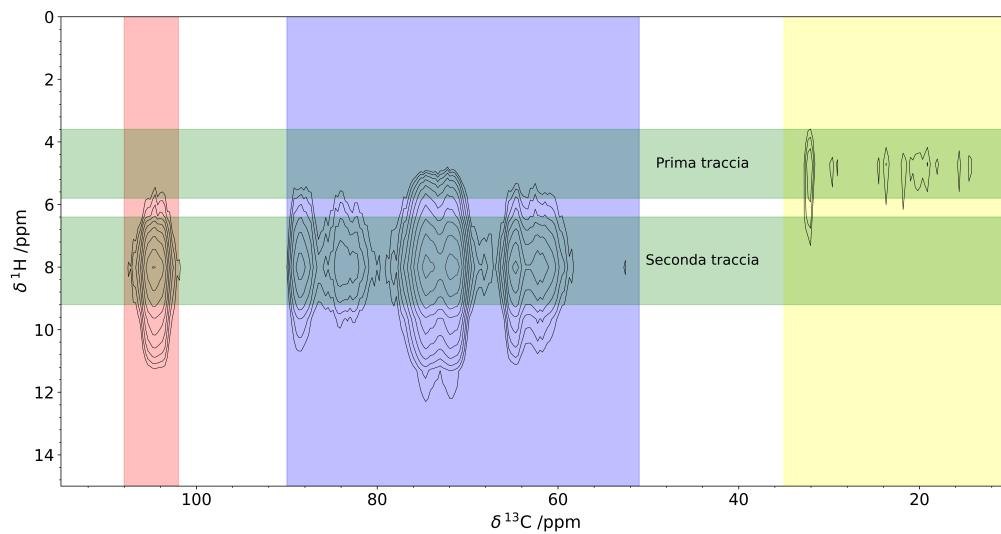


Figure 15: Spettro bidimensionale *Polistes dominula*

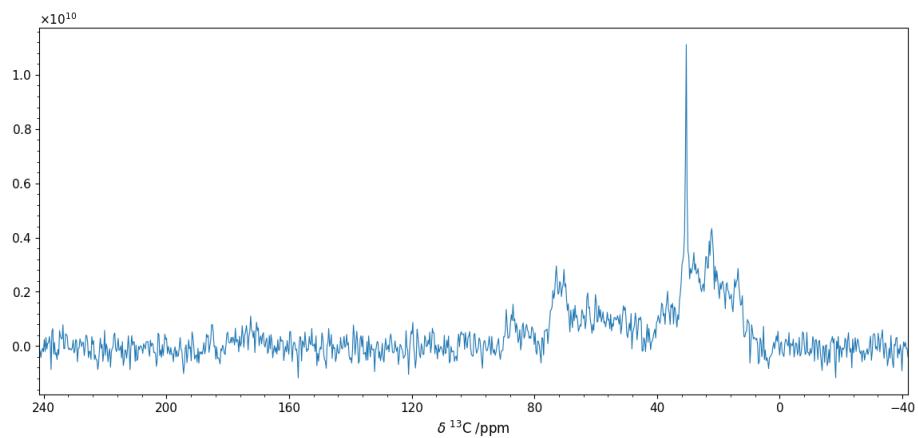


Figure 16: Prima traccia del segnale del protone

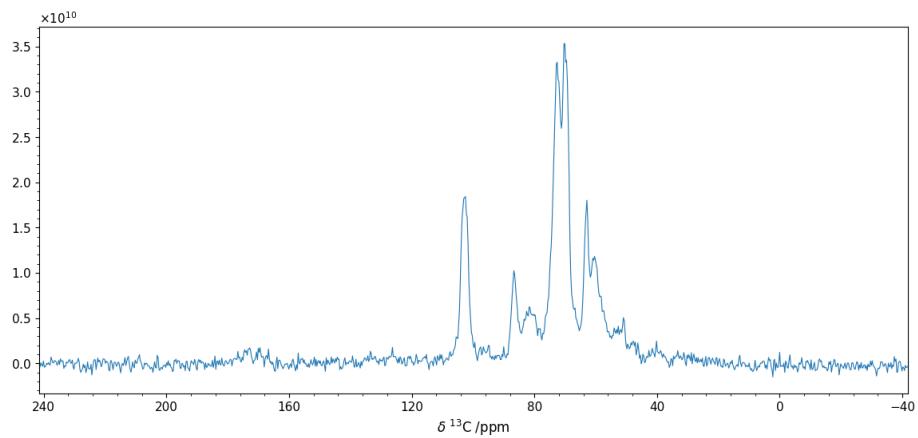


Figure 17: Seconda traccia del segnale del protone *Polistes dominula*

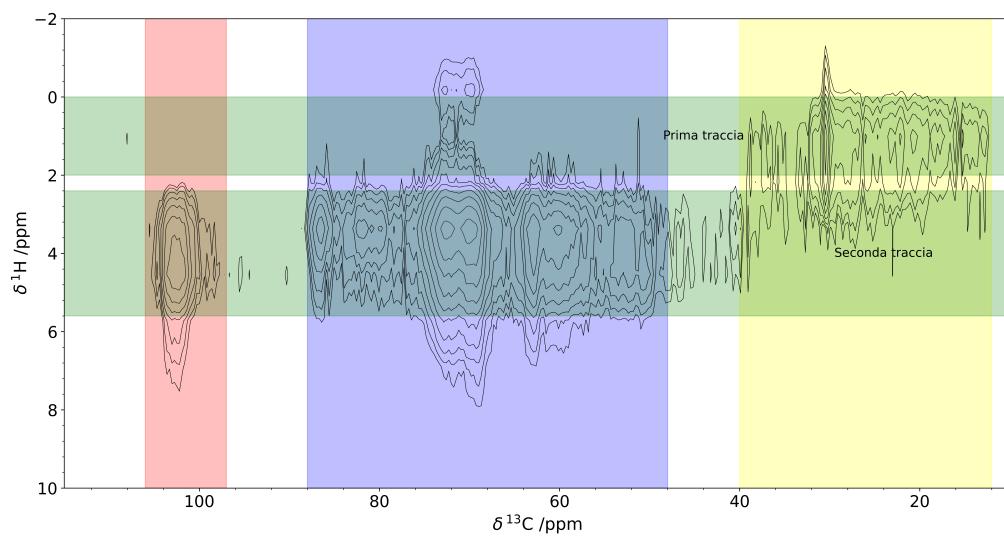


Figure 18: Spettro bidimensionale *Polistes gallicus*

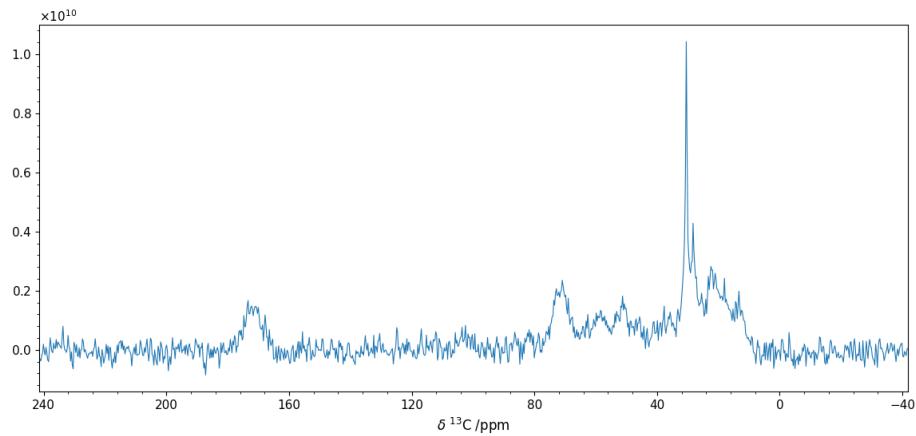


Figure 19: Prima traccia del segnale del protone *Polistes gallicus*

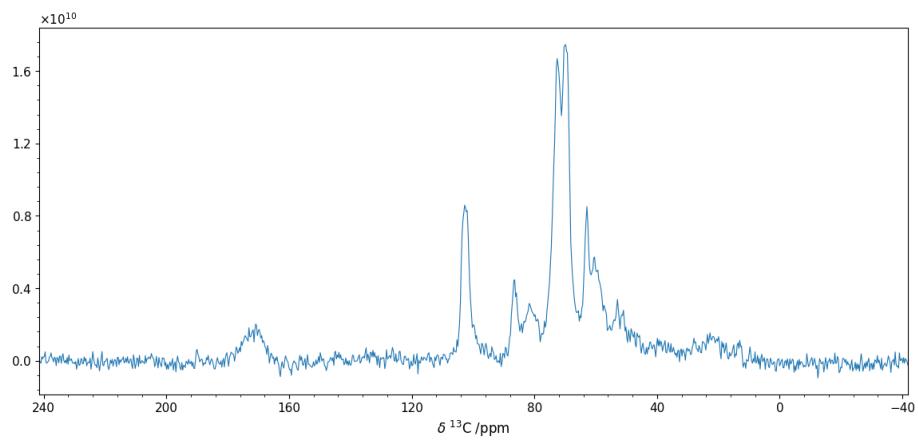


Figure 20: Seconda traccia del segnale del protone *Polistes gallicus*

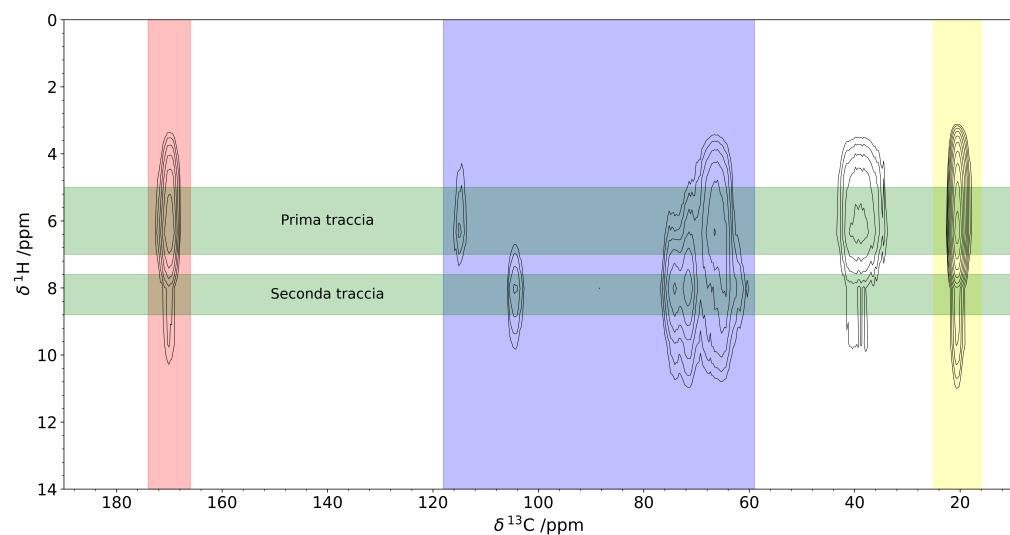


Figure 21: Spettro bidimensionale *Vespa vulgaris*

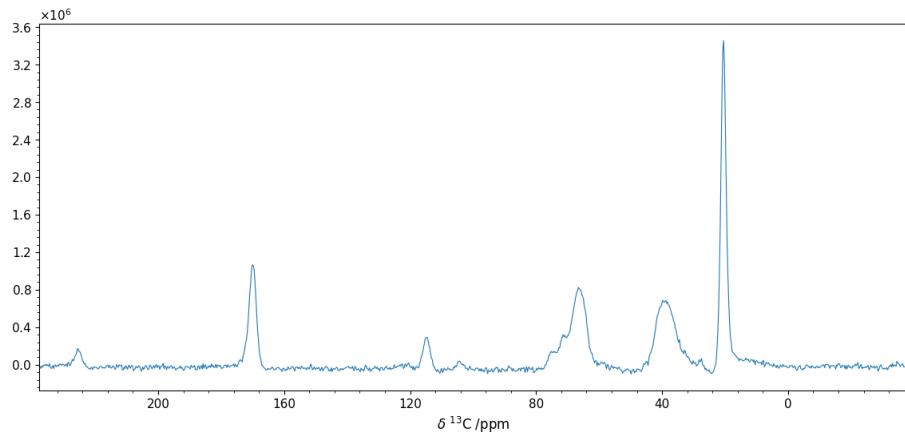


Figure 22: Prima traccia del segnale del protone *Vespa vulgaris*

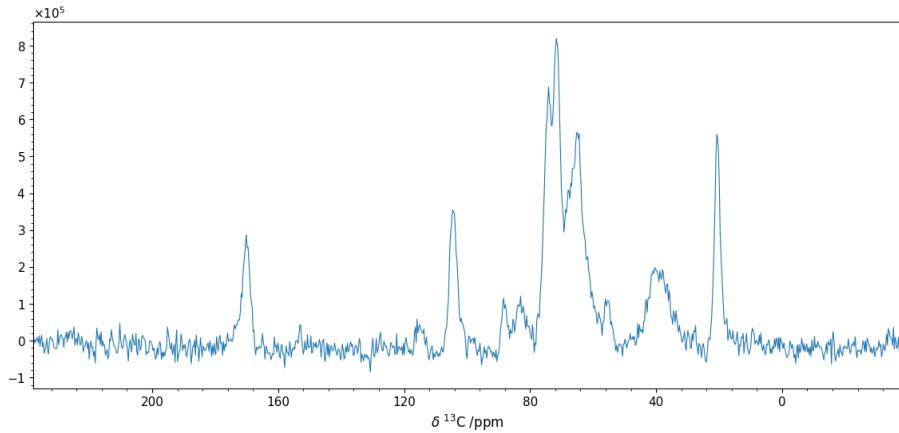


Figure 23: Seconda traccia del segnale del protone *Vespa vulgaris*

3

RISULTATI ED ELABORAZIONE DATI

L'obiettivo principale di questo capitolo è quello di elaborare i risultati e dati ottenuti durante le analisi. Sono state osservate le strutture delle proteine predette con AlphaFold e confrontate con un modello di cellulosa per determinare come queste possano combinarsi nella struttura interna dei nidi.

Gli spettri di ^{13}C ottenuti per i diversi campioni sono stati elaborati, è stato eliminato il rumore ed è stato fatto il fitting della zona relativa al segnale del carbonio 1 e del carbonio 4 per determinare la composizione della frazione di cellulosa presente.

3.1 STRUTTURA PROTEICA

Tramite la struttura tridimensionale predetta usando AlphaFold si è cercato di analizzare come la componente proteica si associasse alla componente cellulosa dei nidi. Il modello sfruttato per considerare come le proteine e cellulosa interagissero si è semplificato considerando solo la possibilità di formazione di interazioni intermolecolari di tipo Van der Walls. Tramite le sequenze aminoacidiche delle proteine in esame si sono ottenuti dati relativi all'energia di solvatazione e all'accessibilità del solvente ai residui proteici, usati poi in uno script in python in modo da ricavare come una superficie, che simula il ruolo della cellulosa, si posizionasse rispetto alle componenti proteiche [4].

Due delle quattro proteine sono state analizzate considerando solo una parte della loro struttura. Quindi per le proteine 03231 e 08705 sono state rimosse parti di sequenza aminoacidica corrispondente alla iniziale alfa elica presente. Per la proteina 03231 non è stata considerata la sequenza fino al residuo 57 di alanina.

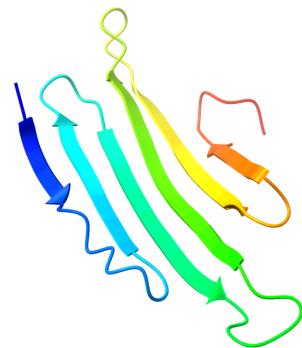


Figure 24: Struttura della proteina 03231 eliminando la porzione ad alfa elica

Mentre per la proteina 08705 non è stata considerata la sequenza fino al residuo 26 di valina.

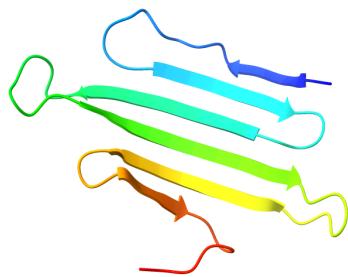


Figure 25: Struttura della proteina 08705 eliminando la porzione ad alfa elica

Con queste due sequenze modificate e con le altre due sequenze intere è stato quindi poi ottenuto il modello che simula il comportamento della cellulosa ottenendo:

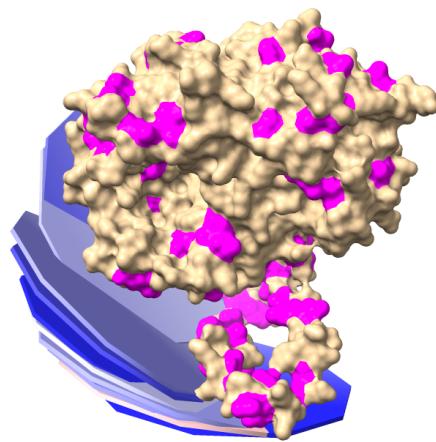


Figure 26: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalle superficie azzurre attorno alla proteina 10508

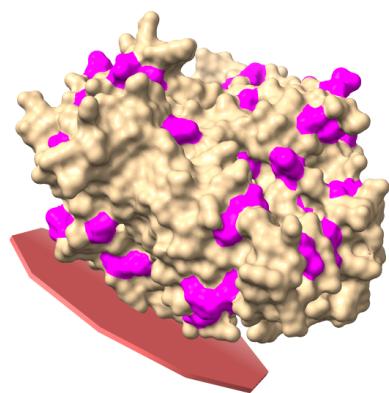


Figure 27: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 04156

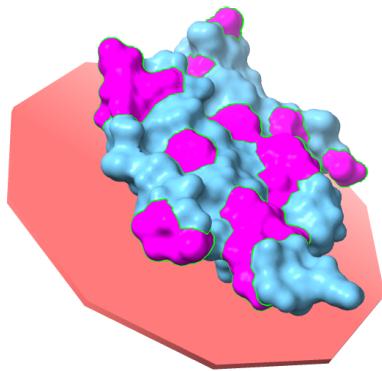


Figure 28: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 08705

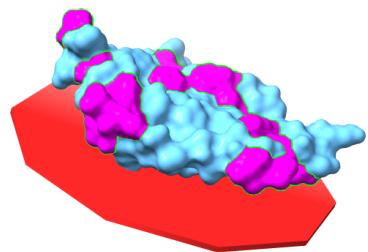


Figure 29: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 03231

3.2 PROCESSING SPETTRI E ASSEGNAZIONE DEI SEGNALI

Una procedura fondamentale per analizzare gli spettri e per poter poi assegnare i differenti segnali presenti è stato il processing. Sfruttando KLASSEZ è stato realizzato uno script in python che permetesse di elaborare gli spettri e aggiustare parametri come ... per poi passare anche al denoising. [8]

```
from klassez import *

path=r'' #file da leggere
s=Pseudo_2D(path)
s.fid,*_=processing.mcr(s.fid,nc=3)

s.procs['wf'][‘mode’] = ‘em’
s.procs['wf'][‘em’] = 50
s.procs[‘zf’] = 8192

s.process()
s.pknl()
s.adjph()

lim1 = {
    "shift" :( -0.1 ,0.1) ,
    "lw" :(100 ,2000) ,
    "ph" :( -np.pi /100 , np.pi /100) ,
    "A" :(0,0) , "B" :(0,0) , "C" :(0,0) , "D" :(0,0) , "E" :(0,0) }

from tragico import f_fit as trfit
trfit.model_fit_1D(path,
    delays_list=[950,2000],
    list_path=['11', '11'],
    option=None,
    dir_name='nuovo',
    cal_lim=None,
    IR=False,
    dofit=True,
    prev_fit=None,

        fast=True,
    limits1 = lim1,
    limits2 = None,
    L1R = None,
    L2R = None,
    err_conf=0.95,
    doexp=False,
    f_int_fit=None,
    fargs=None,
```

```
Spectra=np.array(
    [s.rr[5], s.rr[12]]),
ppmscale=s.ppm_f2,
acqupars=s.acqus,
procpars=s.procs,
Param=None)
```

3.2.1 *Polistes dominula*

Per i campioni di nidi della specie *Polistes dominula* sono stati realizzati spettri NMR al carbonio 13 sia operando con lo spettrometro a 700 MHz che con quello a 800 MHz. Sono stati esaminati due nidi campionanti in momenti differenti, tuttavia gli spettri relativi al campione raccolto precedentemente erano già in possesso. Per questo stesso campione non sono stati inoltre realizzati esperimenti con lo spettrometro a 800 MHz.

Per la zona relativa al segnale dei carboni in posizione 1 della cellulosa si è ottenuto:

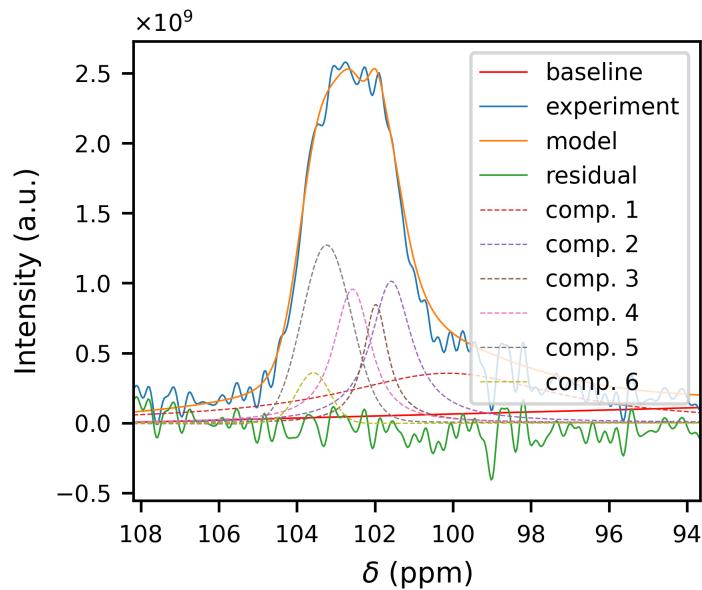


Figure 30: Fit zona C1

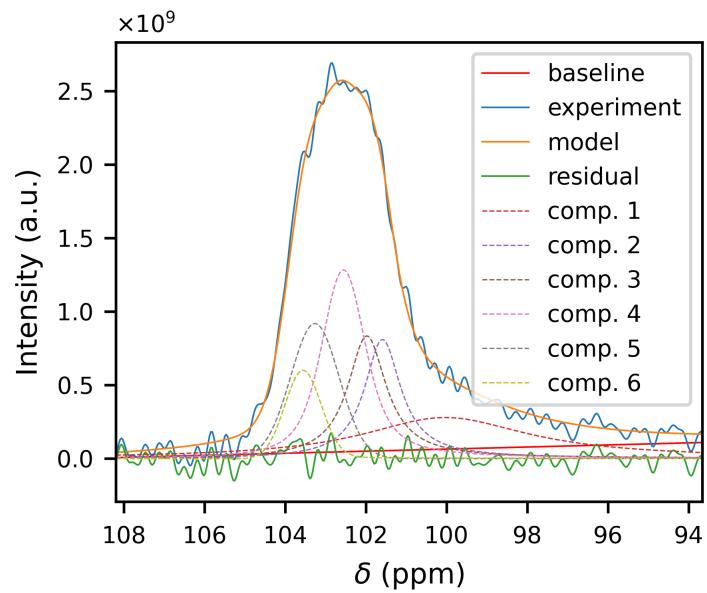


Figure 31: Fit zona C1

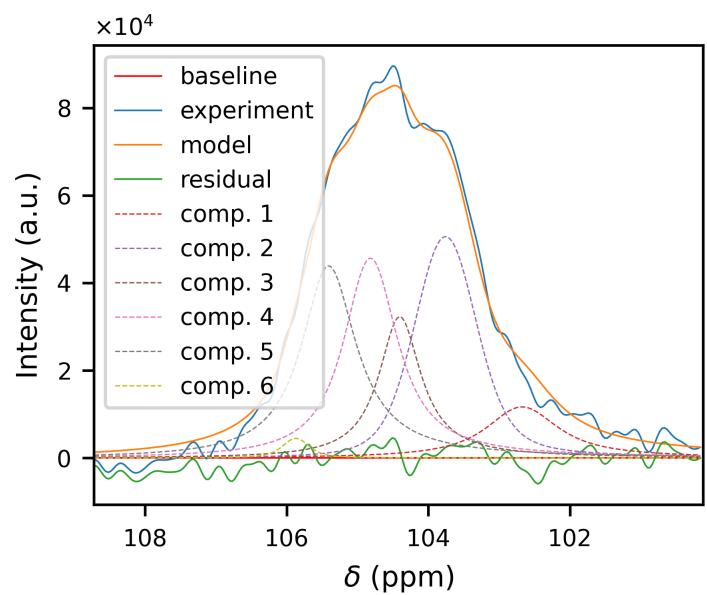


Figure 32: Fit zona C1

Per la zona relativa al segnale dei carboni in posizione 4 della cellulosa si è ottenuto:

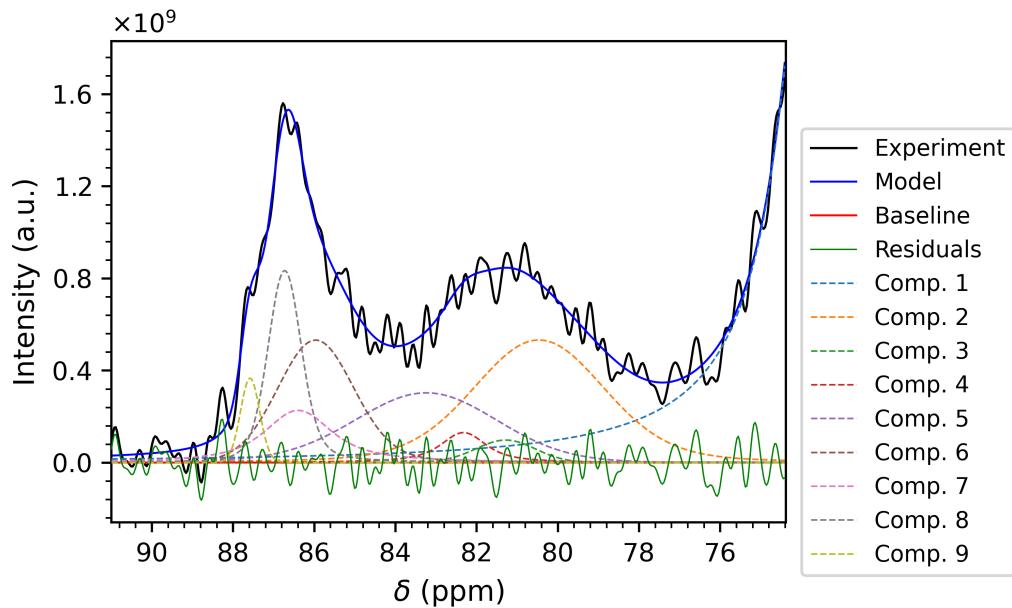


Figure 33: Fit zona C4

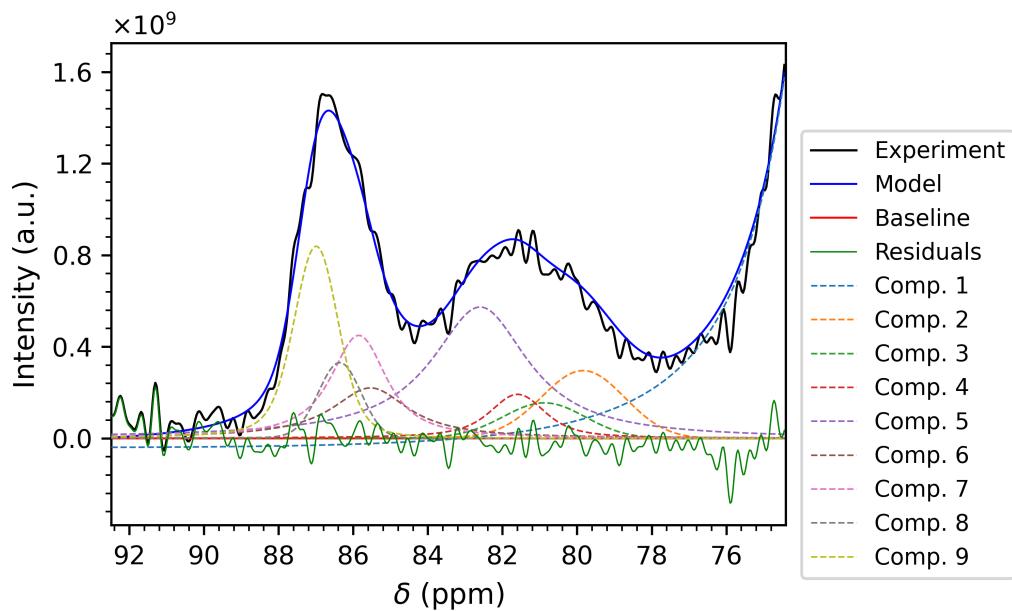


Figure 34: Fit zona C4

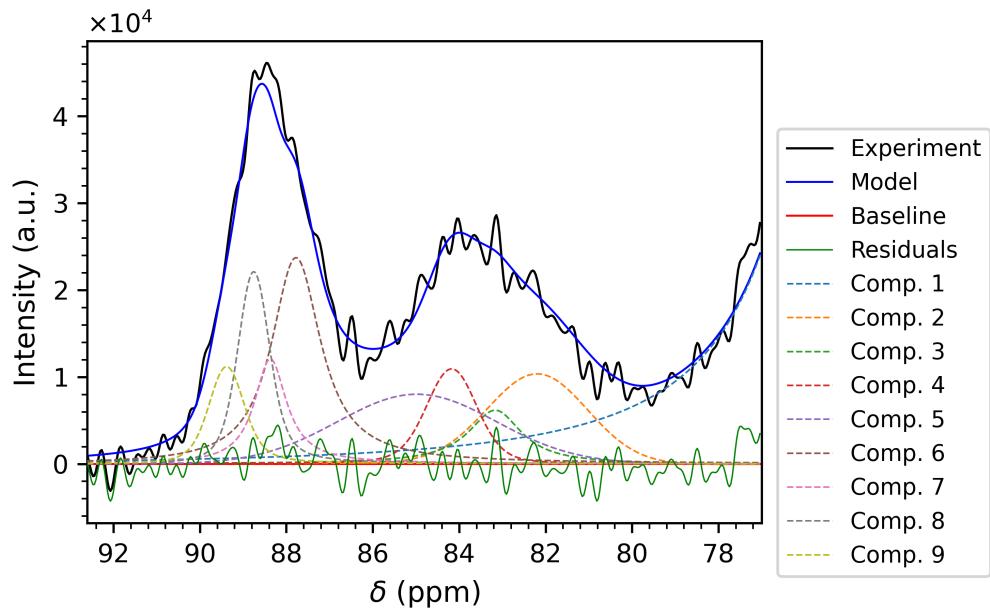


Figure 35: Fit zona C4

3.2.2 *Polistes gallicus*

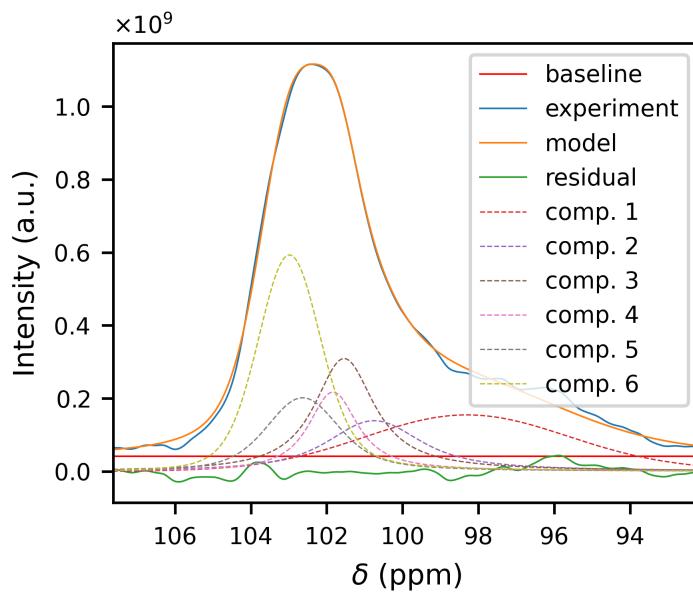


Figure 36: Fit zona C1

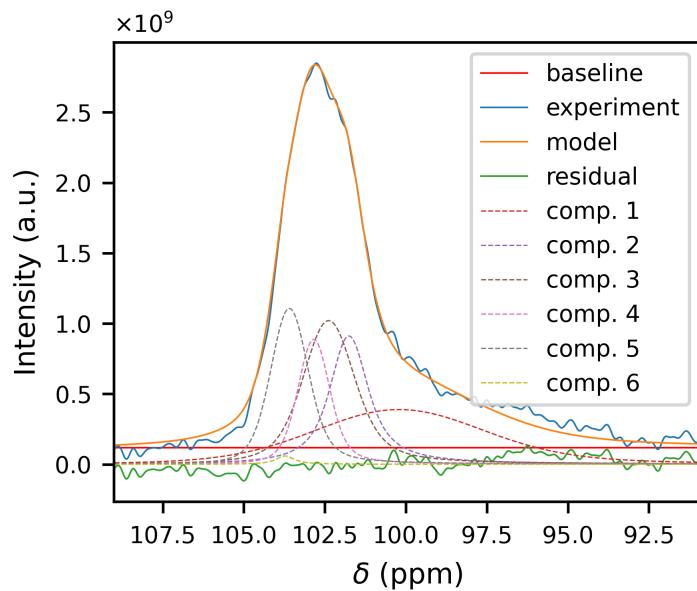


Figure 37: Fit zona C1

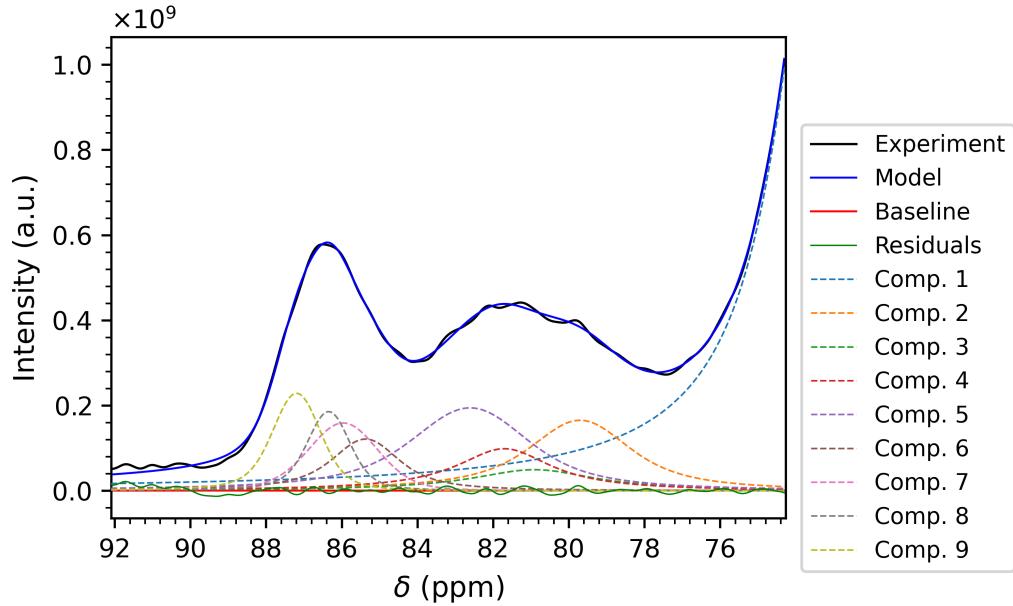


Figure 38: Fit zona C4

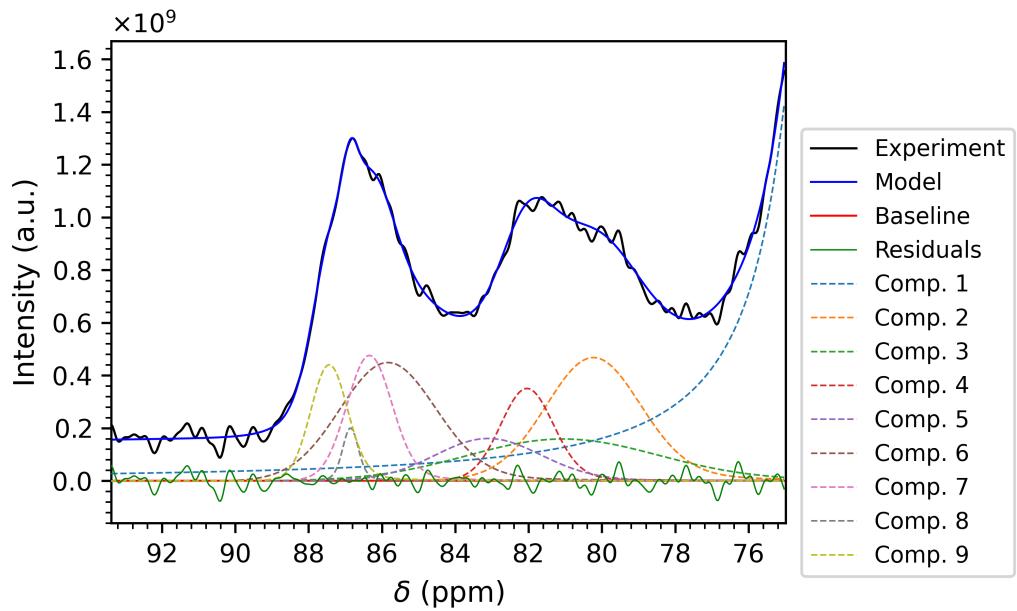


Figure 39: Fit zona C4

3.2.3 *Vespa crabro*

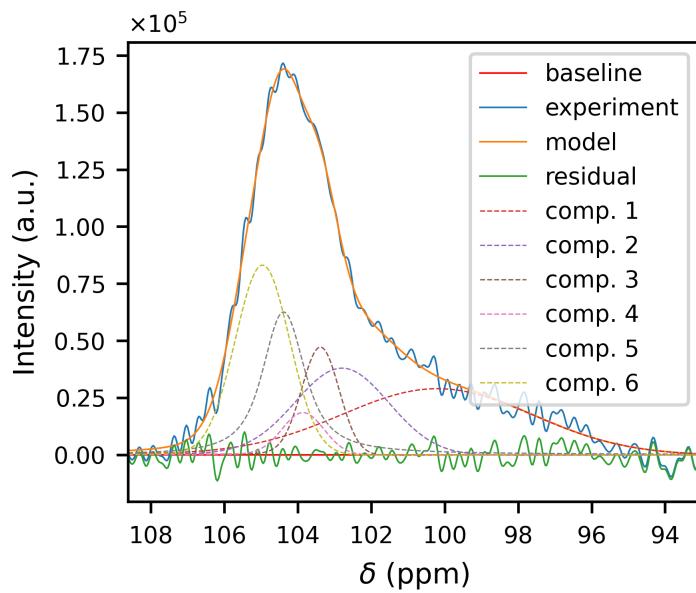


Figure 40: Fit zona C1

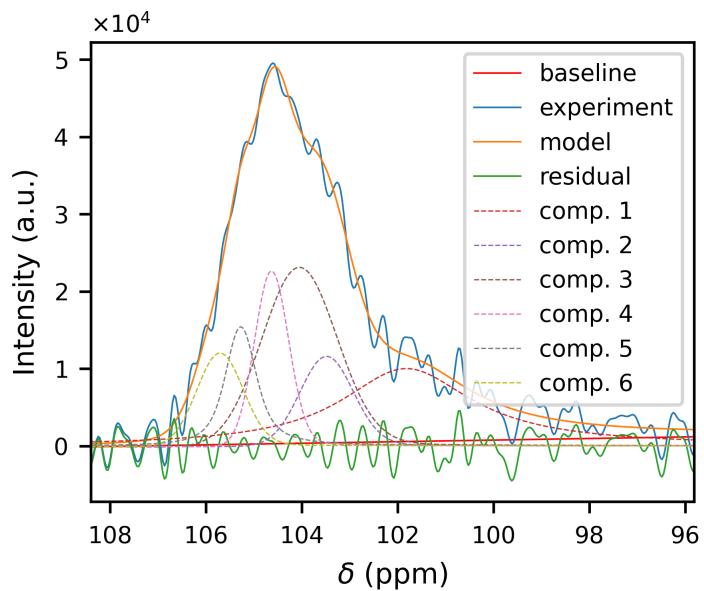


Figure 41: Fit zona C1

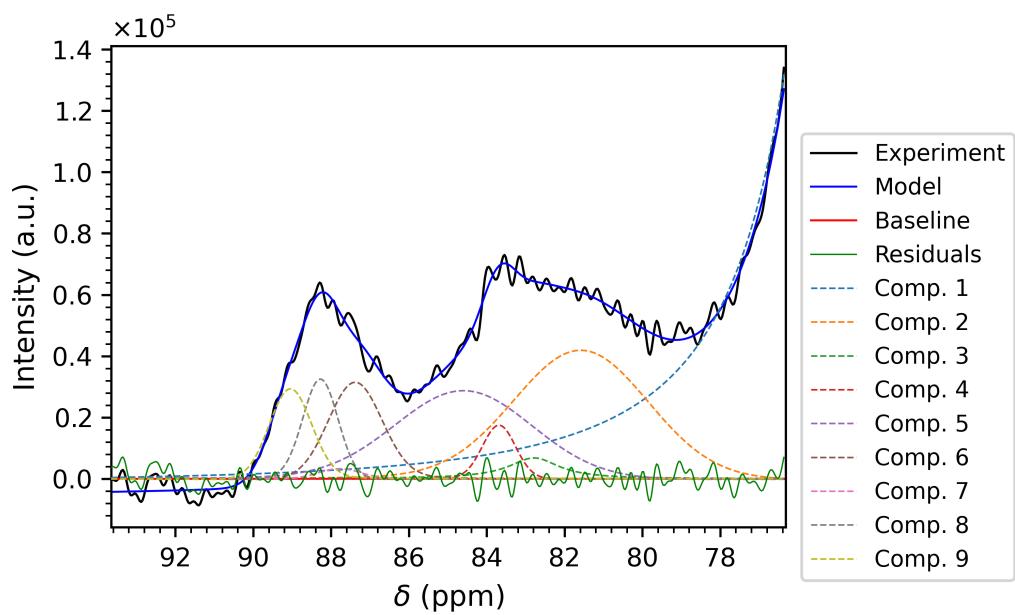


Figure 42: Fit zona C4

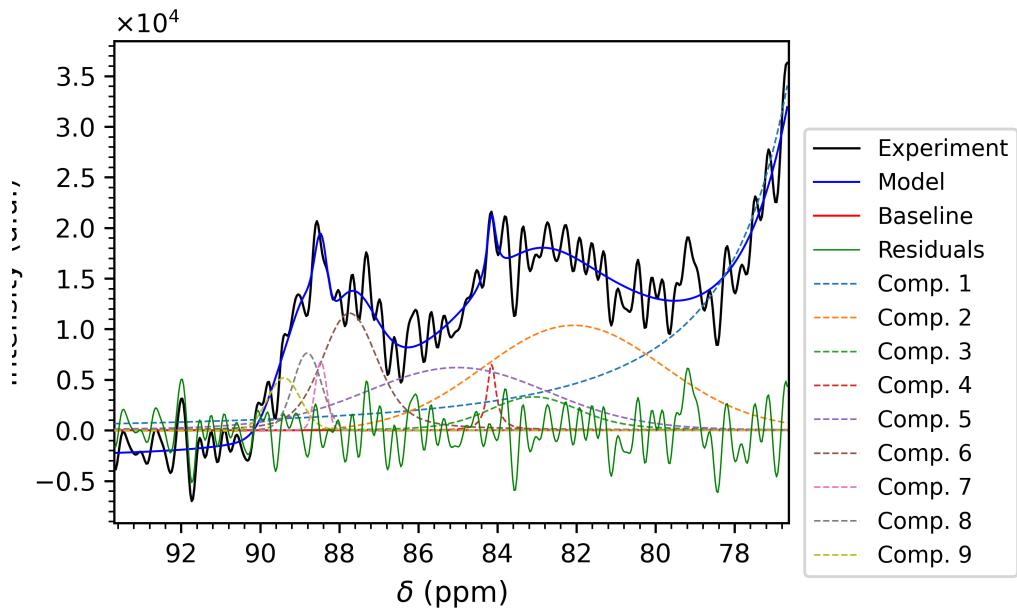


Figure 43: Fit zona C4

3.2.4 *Vespula vulgaris*

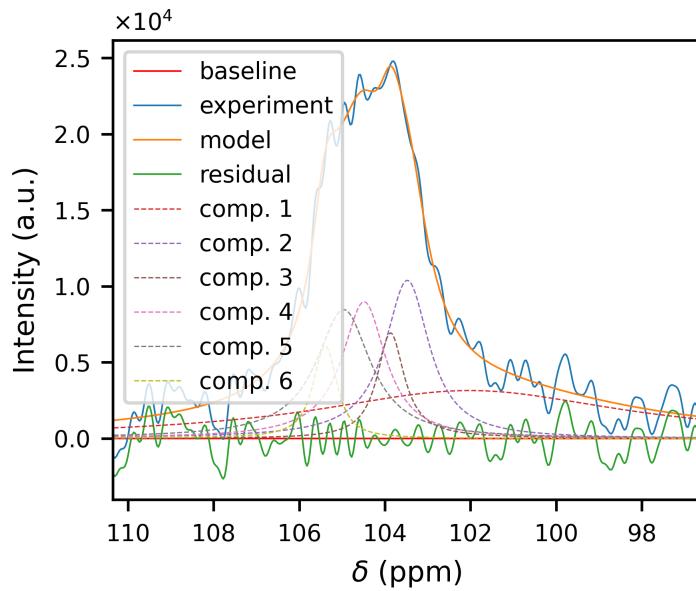


Figure 44: Fit zona C4

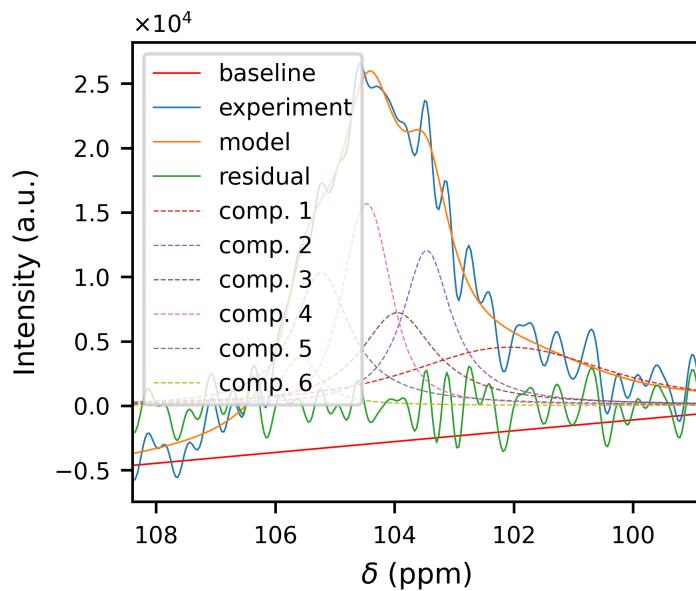


Figure 45: Fit zona C4

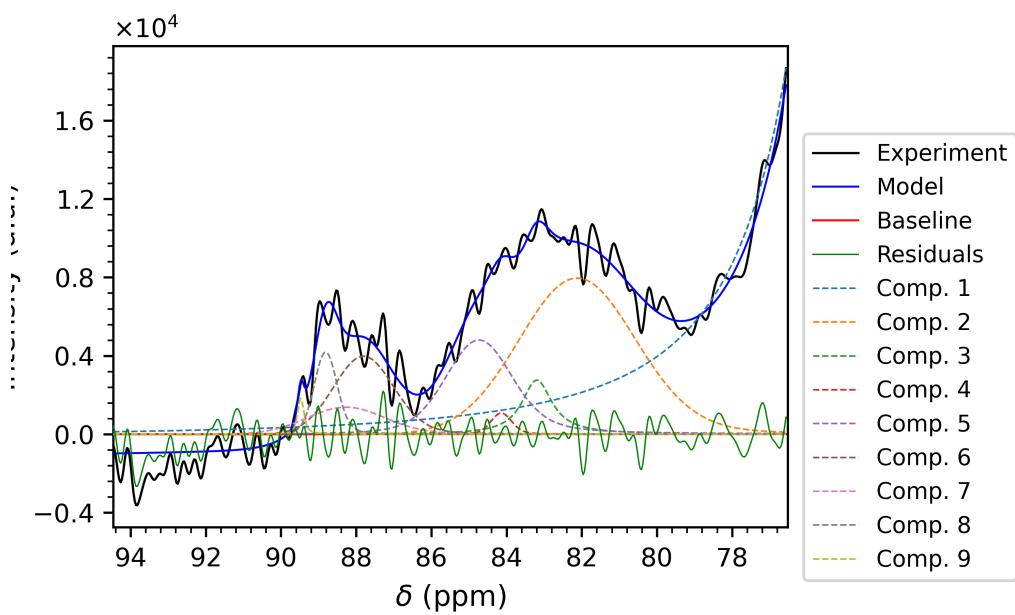


Figure 46: Fit zona C4

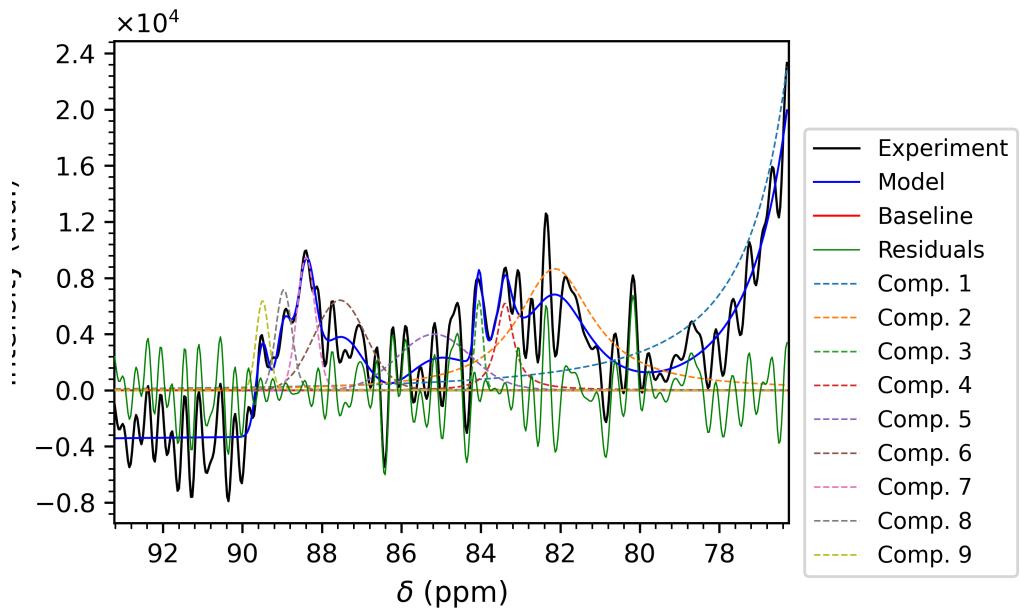


Figure 47: Fit zona C4

3.3 ANALISI DEL SEGNALE PROTEICO

Negli spettri ottenuti è presente anche segnale NMR relativo alle componenti proteiche dei nidi. Questi segnali si ritrovano principalmente nella zona compresa tra 160 e 180 ppm, segnale relativo alla funzionalità carbonilica degli aminoacidi delle proteine, e tra i 20 e 60 ppm. L'assegnazione dei segnali delle proteine è stato effettuato sfruttando un programma che restituisce nello spettro una predizione di questo segnale partendo dalla sequenza aminoacidica. [12]

Le proteine di maggiore interesse per il quale è stata effettuata questa analisi sono quelle che hanno mostrato una migliore interazione con la cellulosa, ossia le due proteine PdomMRNAr1.2-03231.1 PdomMRNAr1.2-08705.1, ed è stata effettuata questa ricerca solo sullo spettro di *Polistes dominula*. Nelle immagini sottostanti sono riportati i risultati ottenuti.

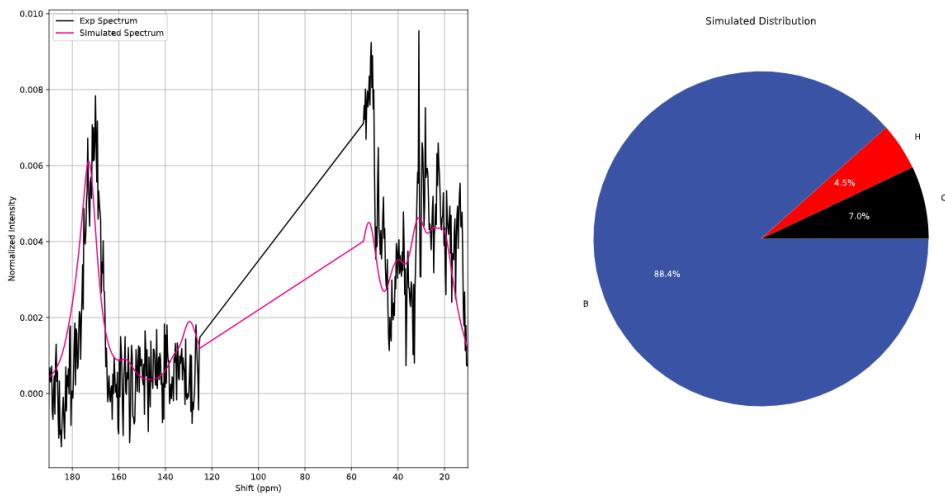


Figure 48: Predizione del segnale proteico sullo spettro di *Polistes dominula*

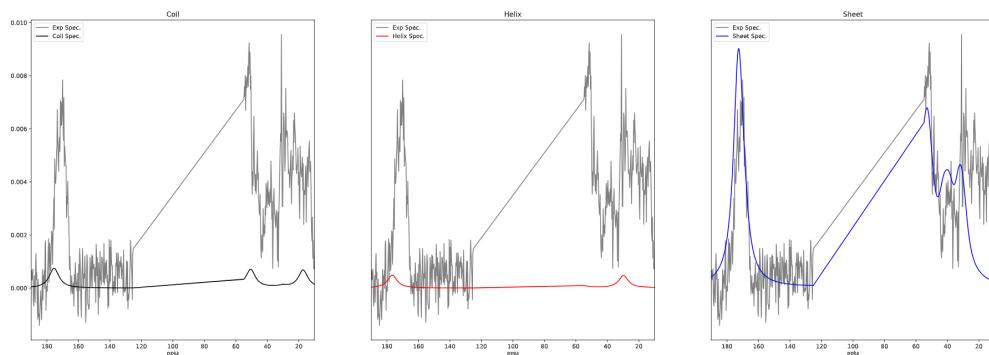


Figure 49: Contribuzione del segnale da parte delle differenti strutture secondarie

La predizione riportata nelle immagini fa riferimento ad entrambe le proteine; a causa della loro estrema somiglianza queste due restituiscono la medesima predizione. Per effettuare questa predizione è stato considerato lo spettro di *Polistes dominula* escludendo la zona in cui si ha solamente il segnale associato alla cellulosa, ossia tra 60 e 120 ppm circa. Dai risultati ottenuti si evince che c'è un ottimo accordo tra la predizione effettuata e il segnale proteico presente nello spettro. Si può anche notare che la maggior parte del segnale è associato ad una struttura di tipo foglietto beta, questo è perfettamente in accordo con la struttura delle proteine predette con Alphafold [10], che appunto presentavano una

corta catena ad alfa elica e per il resto la struttura era appunto a foglietto beta.

4

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] Linda Cerofolini, Marco Fragai, Claudio Luchinat, and Enrico Ravera. Orientation of immobilized antigens on common surfaces by a simple computational model: Exposition of sars-cov-2 spike protein rbd epitopes. *Biophysical Chemistry*, 265:106441, 2020.
- [5] 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.
- [6] Tracy Curtis, Yaira Aponte, and Nancy Stamp. Nest paper absorbency, toughness, and protein concentration of a native vs. an invasive social wasp. *Journal of chemical ecology*, 31:1089–100, 06 2005.
- [7] Karl E. Espelie and Henry R. Hermann. Surface lipids of the social wasp *polistes annularis* (l.) and its nest and nest pedicel. *Journal of Chemical Ecology*, 16(6):1841–1852, 1990.
- [8] Letizia Fiorucci, Francesco Bruno, Leonardo Querci, Adam Kubrak, Jlenia Bindi, Nebojša Rodić, Giulia Licciardi, Enrico Luchinat, Giacomo Parigi, Mario Piccioli, and Enrico Ravera. Extracting trends from nmr data with tragicò: A python toolbox. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 63, 06 2025.

- [9] R. Jeanne. The adaptiveness of social wasp nest architecture. *Quarterly Review of Biology - QUART REV BIOL*, 50, 09 1975.
- [10] John Jumper, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Anna Žídek, Anna Potapenko, Alex Bridgland, Clemens Meyer, Simon A. A. Kohl, Andrew J. Ballard, Andrew Cowie, Bernardino Romera-Paredes, Stanislav Nikolov, Rishub Jain, Jonas Adler, Trevor Back, Stig Petersen, David Reiman, Ellen Clancy, Michal Zielinski, Martin Steinegger, Michalina Pacholska, Theresa Berghammer, Sebastian Bodenstein, Dylan Silver, Oriol Vinyals, Andrew W. Senior, Koray Kavukcuoglu, Pushmeet Kohli, and Demis Hassabis. Highly accurate protein structure prediction with alphafold. *Nature*, 596(7873):583–589, 2021.
- [11] 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.
- [12] Haote Li, Marcus D. Tuttle, Kurt W. Zilm, and Victor S. Batista. Rapid quantification of protein secondary structure composition from a single unassigned 1d 13c nuclear magnetic resonance spectrum. *Journal of the American Chemical Society*, 146(40):27542–27554, 2024. Published: October 9, 2024.
- [13] E Schmolz, N Brüders, R Daum, and Ingolf Lamprecht. Thermoanalytical investigations on paper covers of social wasps. *Thermochimica Acta*, 361:121–129, 10 2000.
- [14] Theresa L. Singer, Karl E. Espelie, and David S. Himmelsbach. Ultrastructural and chemical examination of paper and pedicel from laboratory and field nests of the social wasp *polistes metricus say*. *Journal of Chemical Ecology*, 18(1):77–86, 1992.
- [15] Stanford–Brown–Spelman iGEM Team. Material waterproofing, 2014. Content & Development © Stanford–Brown–Spelman iGEM 2014.