



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

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	11
3 Metodi di analisi	15
3.1 Preparazione dei campioni	15
3.2 Tecniche di analisi	16
3.3 Risultati e spettri ottenuti	17
4 Risultati ed elaborazione dati	19
4.1 Struttura proteica	19
4.2 Processing spettri e assegnazione del segnale	22
4.2.1 Polistes dominula	23
4.2.2 Polistes gallicus	26
4.2.3 Vespa crabro	26
4.2.4 Vespula	26
5 Conclusions and Future work	27
Bibliography	29

LIST OF FIGURES

Figure 1	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-03231.1 predetta con Alphafold	12
Figure 2	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-08705.1 predetta con Alphafold	13
Figure 3	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-10508.1 predetta con Alphafold	13
Figure 4	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-04156.1 predetta con Alphafold	14
Figure 5	Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento	16
Figure 6	Struttura della proteina 03231 eliminando la porzione ad alfa elica	20
Figure 7	Struttura della proteina 08705 eliminando la porzione ad alfa elica	20
Figure 8	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalle superficie azzurre attorno alla proteina 10508	21
Figure 9	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 04156	21
Figure 10	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 08705	22
Figure 11	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 03231	22
Figure 12	Fit zona C1	23
Figure 13	Fit zona C1	24
Figure 14	Fit zona C1	24
Figure 15	Fit zona C4	25
Figure 16	Fit zona C4	25
Figure 17	Fit zona C4	26

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

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 [10].

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 [10, 8], 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 comportamneti caratteristici, in particolare in questo studio è di interesse il diverso modo di nidificare, i differenti materiali usati durante la nidifiaczione 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 cartteristiche comuni, per esmepio 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, e 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]

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 [11].

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 [5], oltre a segatura, tricomi, epidermide fogliare, alghe e polline [3]. Per quello che 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 norvegica*, 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*

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 ultrastutturale 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 Ialfa 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.

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 [12]. Questa secrezione è descritta come una proteina simil-seta (silklake protein) o mucoproteina, e viene aggiunta alla polpa di cellulosa durante il processo di costruzione [13, 7]. Chimicamente, questa secrezione si indurisce rapidamente e irreversibilmente in una sostanza cornea insolubile e idrorepellente, essenziale per l'impermeabilizzazione e il rafforzamento del nido [12, 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 per cento dei residui identificati) [13]. In particolare, la presenza relativamente elevata di prolina (10.6-12.5 per cento nei nidi di *P. metricus*) è significativa, in quanto contribuisce alla resistenza strutturale del nido, essendo un amminoacido dominante nelle proteine strutturali [13]. 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 [14]. Partendo poi da questo studio si è andato a ricercare la sequenza aminoacidica relativa, dalla quale è stata predetta la struttura tridimensionale usando AlphaFold [9].

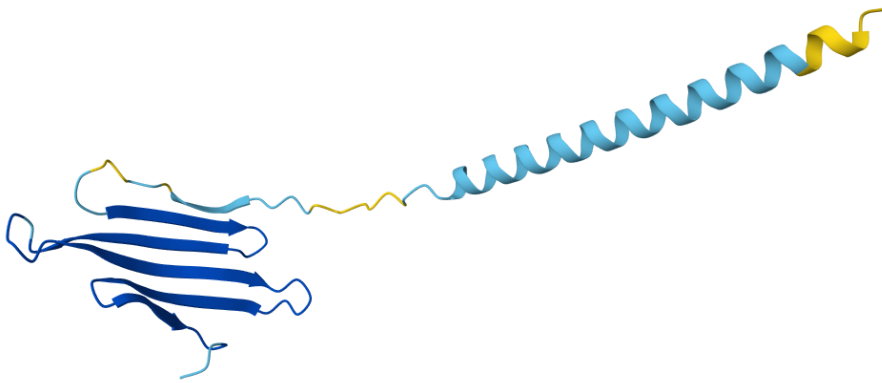


Figure 1: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-03231.1 predetta con AlphaFold



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



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

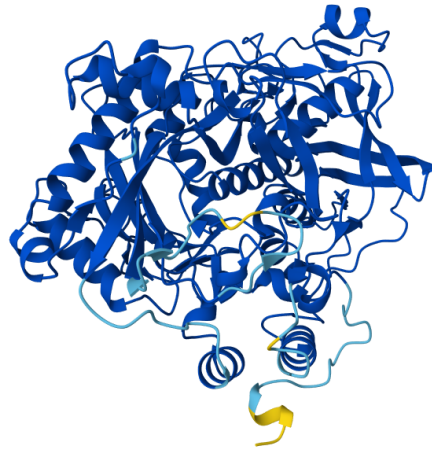


Figure 4: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-04156.1 predetta con Alphafold

Sono state riportate le strutture di quattro delle proteine, PdomMRNAr1.2-03231.1, PdomMRNAr1.2-08705.1, PdomMRNAr1.2-10508.1 e PdomMRNAr1.2-04156.1. Altre due proteine erano state individuate, tuttavia per una di queste non era stato possibile determinare la sequenza aminoacidica, mentre per l'altra non si riusciva a ottenere una predizione della struttura soddisfacente.

Le strutture delle altre quattro proteine sono state invece 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.

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 preliminari 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 componenti dei nidi.

Le analisi sono state condotte con due diversi spettrometri che lavorano con intensità di campo differenti, 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

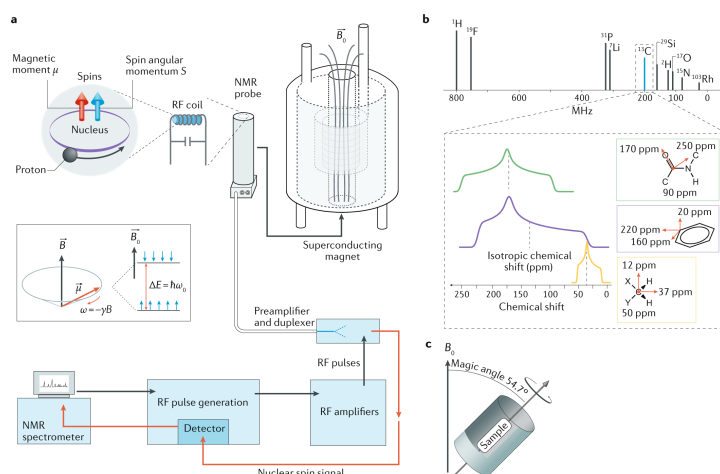


Figure 5: Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento

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 poichè 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

3.3 RISULTATI E SPETTRI OTTENUTI

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.

4.1 STRUTTURA PROTEICA

Tramite la struttura tridimensionale predetta usando Alphafold si è cercato di analizzare come la componente proteiche si associasse alla componente cellulosica 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 Waals. 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.

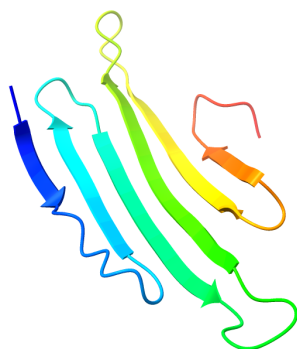


Figure 6: Struttura della proteina 03231 eliminando la porzione ad alfa elica

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

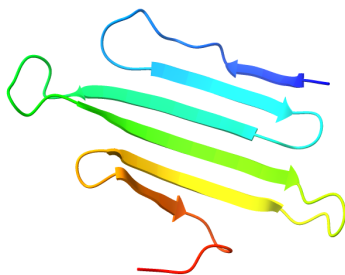


Figure 7: Struttura della proteina 08705 eliminando la porzione ad alfa elica

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:

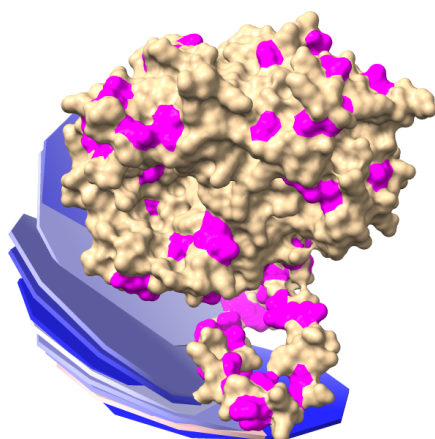


Figure 8: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalle superficie azzurre attorno alla proteina 10508

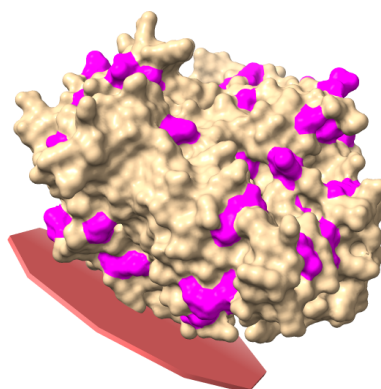


Figure 9: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 04156

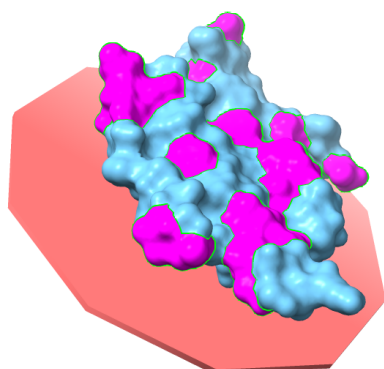


Figure 10: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 08705

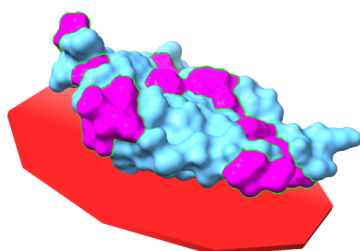


Figure 11: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 03231

4.2 PROCESSING SPETTRI E ASSEGNAZIONE DEL SEGNALE

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 permettesse di elaborare gli spettri e aggiustare parametri come ... per poi passare anche al denoising.

```
from klassez import *
```



```

path=r'percorso del file'
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()

```

4.2.1 *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:

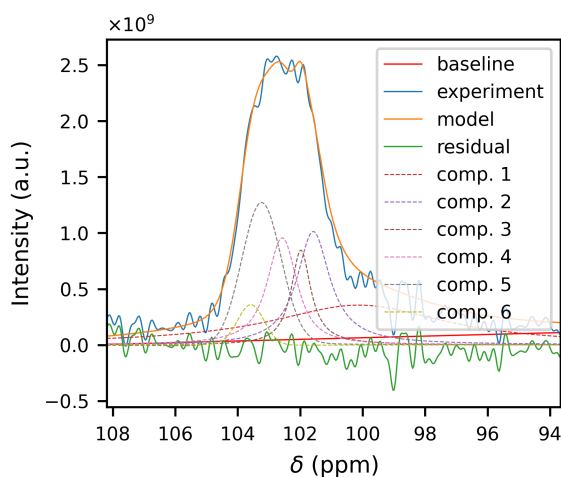


Figure 12: Fit zona C1

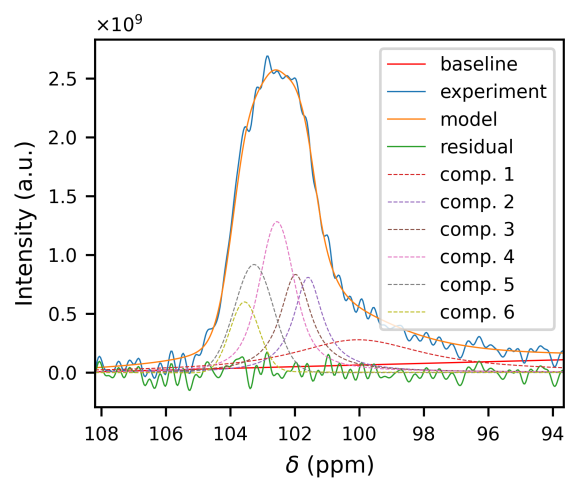


Figure 13: Fit zona C1

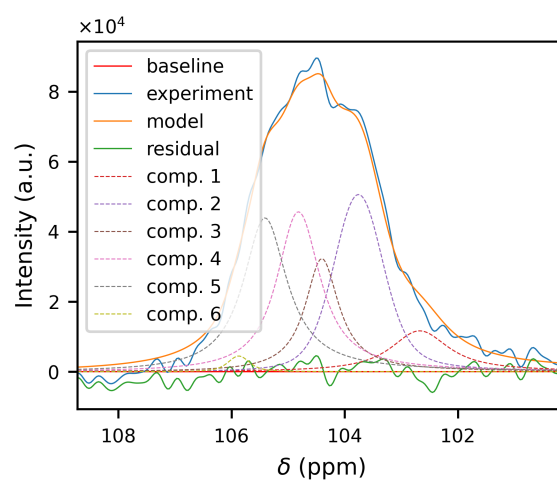


Figure 14: Fit zona C1

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

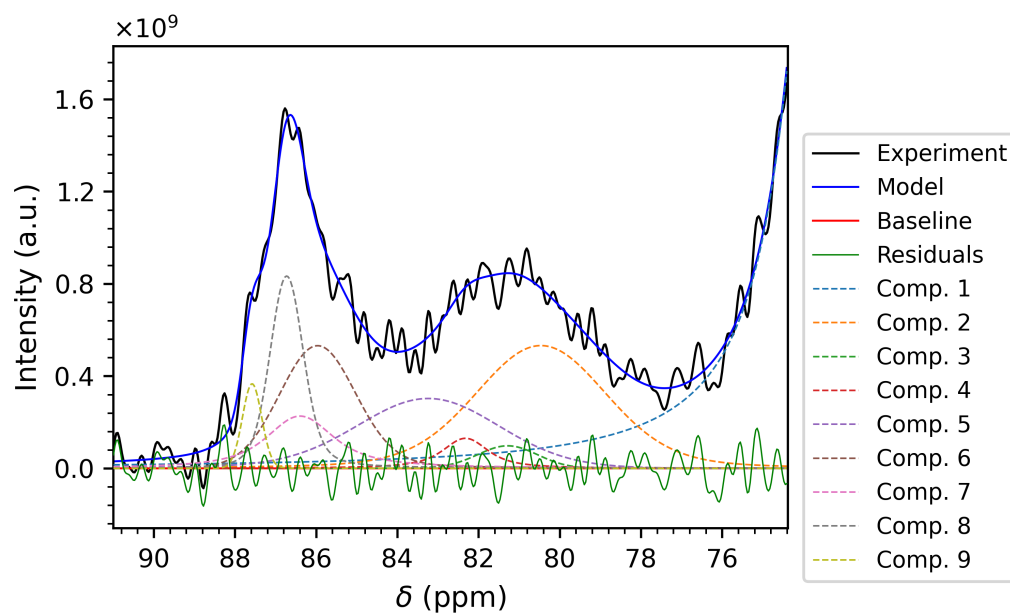


Figure 15: Fit zona C4

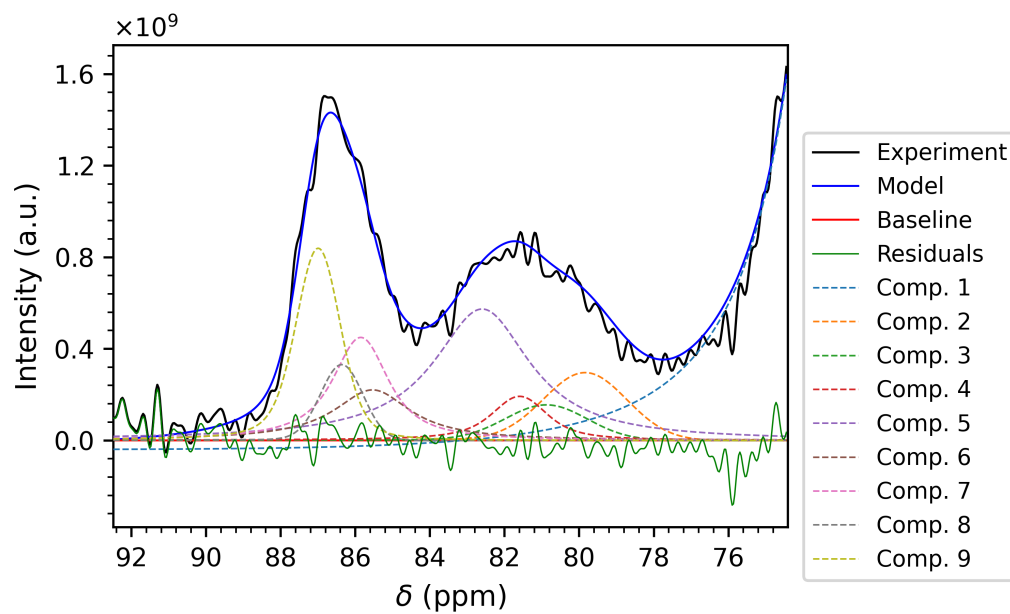


Figure 16: Fit zona C4

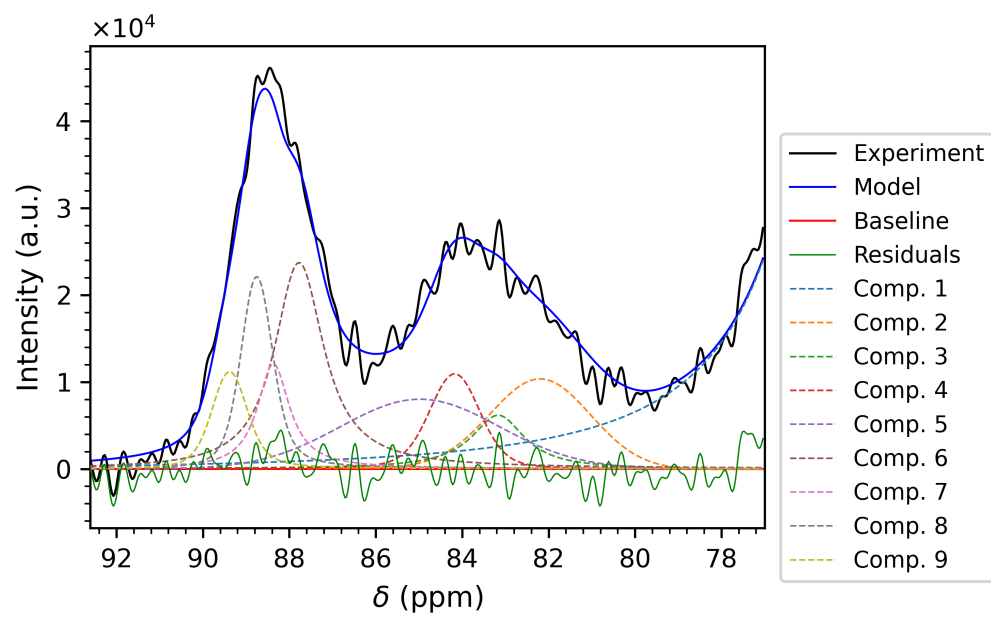


Figure 17: Fit zona C4

4.2.2 *Polistes gallicus*

4.2.3 *Vespa crabro*

4.2.4 *Vespula*

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 Bağriaçık. 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 Bağriaçık. 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] Henri Goulet and John Huber. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. 01 1993.
- [9] John Jumper, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Anna Židek, 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.
- [10] 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.
- [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] E Schmolz, N Brüders, R Daum, and Ingolf Lamprecht. Thermoanalytical investigations on paper covers of social wasps. *Thermochimica Acta*, 361:121–129, 10 2000.
- [13] 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.
- [14] Stanford–Brown–Spelman iGEM Team. Material waterproofing, 2014. Content & Development © Stanford–Brown–Spelman iGEM 2014.