



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 Materiali costitutivi dei nidi	11
1.2.1 Materiale fibroso	11
1.2.2 Cellulosa	12
1.2.3 Materiale proteico	13
2 Metodi di analisi	17
2.1 Preparazione dei campioni	17
2.2 Tecniche di analisi	18
2.3 Risulati e spettri ottenuti	20
2.3.1 Spettri monodimensionali	20
2.3.2 Spettri bidimensionali	25
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 Conclusioni e osservazioni finali	49
Bibliography	51

LIST OF FIGURES

Figure 1	Albero filogenetico dei Vespidi, con la posizione dei generi <i>Polistes</i> , <i>Vespula</i> e <i>Vespa</i>	10
Figure 2	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-03231.1 predetta con Alphafold	14
Figure 3	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-08705.1 predetta con Alphafold	14
Figure 4	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-10508.1 predetta con Alphafold	15
Figure 5	Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-04156.1 predetta con Alphafold	15
Figure 6	Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento	18
Figure 7	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vecchio di <i>Polistes dominula</i> (700MHz)	20
Figure 8	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di <i>Polistes dominula</i> (800MHz)	21
Figure 9	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di <i>Polistes dominula</i> (800MHz)	21
Figure 10	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vecchio <i>Polistes gallicus</i> (700MHz)	22
Figure 11	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di <i>Polistes gallicus</i> (700MHz)	22
Figure 12	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR delle celle di <i>Vespa crabro</i> (800MHz)	23
Figure 13	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di <i>Vespa crabro</i> (800MHz)	23
Figure 14	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR delle celle di <i>Vespula vulgaris</i> (800MHz)	24
Figure 15	Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di <i>Vespula vulgaris</i> (800MHz)	24
Figure 16	Spettro bidimensionale <i>Polistes dominula</i>	25
Figure 17	Prima traccia del segnale del protone	25
Figure 18	Seconda traccia del segnale del protone <i>Polistes dominula</i>	26

4 LIST OF FIGURES

Figure 19	Spettro bidimensionale <i>Polistes gallicus</i>	26
Figure 20	Prima traccia del segnale del protone <i>Polistes gallicus</i>	27
Figure 21	Seconda traccia del segnale del protone <i>Polistes gallicus</i>	27
Figure 22	Spettro bidimensionale <i>Vespula vulgaris</i>	28
Figure 23	Prima traccia del segnale del protone <i>Vespula vulgaris</i>	28
Figure 24	Seconda traccia del segnale del protone <i>Vespula vulgaris</i>	29
Figure 25	Struttura della proteina 03231 eliminando la porzione ad alfa elica	32
Figure 26	Struttura della proteina 08705 eliminando la porzione ad alfa elica	32
Figure 27	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalle superficie azzurre attorno alla proteina 10508	33
Figure 28	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 04156	33
Figure 29	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 08705	34
Figure 30	Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 03231	34
Figure 31	Fit zona C1	36
Figure 32	Fit zona C1	37
Figure 33	Fit zona C1	37
Figure 34	Fit zona C4	38
Figure 35	Fit zona C4	38
Figure 36	Fit zona C4	39
Figure 37	Fit zona C1	39
Figure 38	Fit zona C1	40
Figure 39	Fit zona C4	40
Figure 40	Fit zona C4	41
Figure 41	Fit zona C1	41
Figure 42	Fit zona C1	42
Figure 43	Fit zona C4	42
Figure 44	Fit zona C4	43
Figure 45	Fit zona C4	43

Figure 46	Fit zona C4	44
Figure 47	Fit zona C4	44
Figure 48	Fit zona C4	45
Figure 49	Predizione del segnale proteico sullo spettro di Polistes dominula	46
Figure 50	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, 10]. 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, 17]. 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, la diversità tassonomica dei Vespidi può essere rappresentata attraverso la loro filogenesi, che mostra la suddivisione in differenti sottofamiglie e generi quali *Polistes*, *Vespula* e *Vespa*. L'albero riportato in Figura 1 evidenzia le relazioni tra alcune delle specie considerate

nello studio. [15] Questa diversità è evidenziata con una vasta gamma di abitudini sociali e morfologiche, si hanno infatti vespidi solitari che hanno abitudine nel realizzare nidi in fango, mentre invece si osserva che vespe di specie eusociali sfruttano la carta come componente principale dei nidi.[10] Sono per l'appunto delle vespe sociali le quattro specie di vespidi che sono stati studiati, ossia *Polistes dominula*, *Polistes gallicus*, *Vespa vulgaris* e *Vespa crabro*.

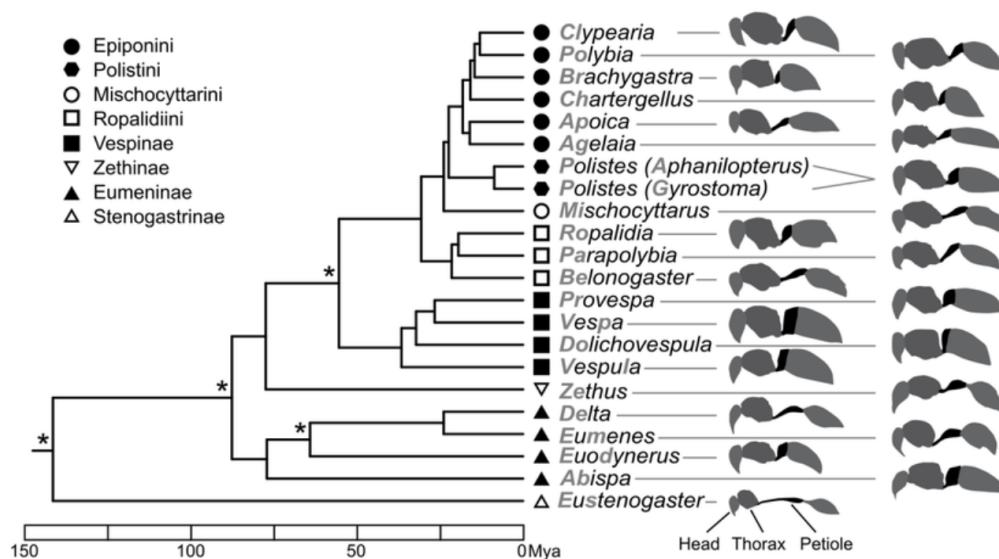


Figure 1: Albero filogenetico dei Vespidi, con la posizione dei generi *Polistes*, *Vespa* e *Vespa*.

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. [10] 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 ginnodomi. [10] 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. [10, 5, 16] 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. [10]

1.2 MATERIALI COSTITUTIVI DEI NIDI

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. [9, 10] 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. [17] 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. [6, 16]

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 [12]. 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 [13].

1.2.1 *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 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. [2] 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]

Si hanno poi specie come *Vespa 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. [5, 16] In specie come appunto *Vespa 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. [5]

1.2.2 *Cellulosa*

I nidi costruiti da questi vespidi, noti per la loro struttura cartacea, si basano fondamentalmente sulla cellulosa come costituente primario della componente fibrosa. [6] Questo materiale viene processato e aggregato dalle vespe con l'ausilio di una secrezione orale proteica. [17] 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. [16]

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 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: cellulosa alfa e cellulosa beta. Sebbene la cellulosa beta sia la forma predominante nelle piante superiori, studi approfonditi hanno rivelato la presenza diffusa di segnali spettrali aggiuntivi, non direttamente riconducibili agli allomorfi cristallini alfa e beta. Nello specifico, la quantificazione spettrale ha identificato un segnale caratteristico che è stato attribuito a una struttura meno ordinata o para-cristallina. Tale iso-

forma manifesta una mobilità molecolare superiore rispetto agli allomorfi cristallini, 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. [13]

1.2.3 *Materiale proteico*

I materiali proteici presenti nei nidi dei vespidi sociali derivano prevalentemente da secrezione orale, che funge da legante o adesivo per le fibre vegetali [16]. Questa secrezione è descritta come una proteina simil-seta o mucoproteina, e viene aggiunta alla polpa di cellulosa durante il processo di costruzione [17, 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 [16, 6].

Le specie del genere *Polistes* incorporano una secrezione orale proteica, definita silklike protein, per cementare le fibre cartacee [17]. Tale proteina strutturale è caratterizzata da un elevato contenuto di amminoacidi quali prolina, glicina, alanina e serina, che conferiscono robustezza al materiale [17, 6]. Un altro elemento caratteristico delle specie del genere *Polistes* è l'applicazione di una secrezione ghiandolare repellente sul peduncolo per la difesa chimica contro le formiche [10]. Al contrario, *Vespula* e *Vespa*, i quali costruiscono nidi chiusi da un involucro, utilizzano materiale proteico descritto come una secrezione simile alla chitina come agente legante per la carta; non è stato riscontrato invece l'uso di repellenti chimici attivi come in *Polistes* [10].

Studi condotti sui nidi della specie *Polistes dominula* hanno permesso di individuare un gruppo di proteine con la probabile funzione di impermeabilizzare il nido [18]. Partendo poi da questo studio si è andato a ricercare la sequenza aminoacidica relativa, dalla quale è stata predetta la struttura tridimensionale usando AlphaFold [11].

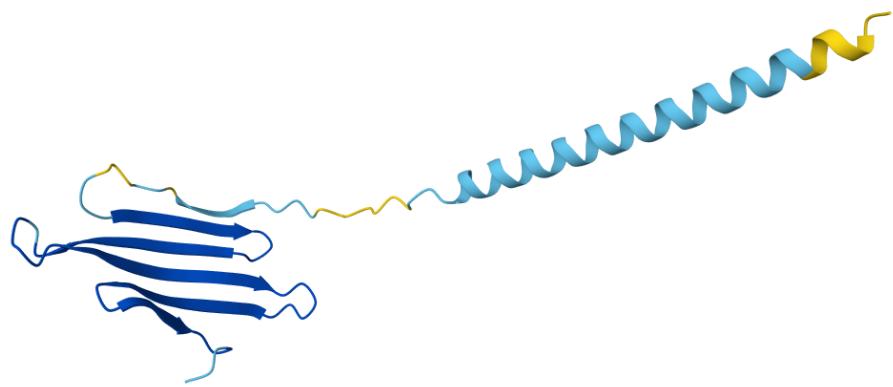


Figure 2: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-03231.1 predetta con AlphaFold



Figure 3: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-08705.1 predetta con AlphaFold



Figure 4: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-10508.1 predetta con AlphaFold

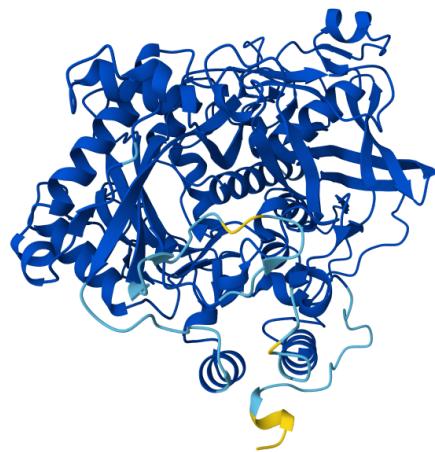


Figure 5: Struttura della proteina PdomMRNAr1.2-04156.1 predetta con AlphaFold

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*, *Vespa vulgaris* 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 del carbonio (^{13}C CP/MAS NMR), 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 MHz e 800 MHz; 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
- *Vespa vulgaris* - 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

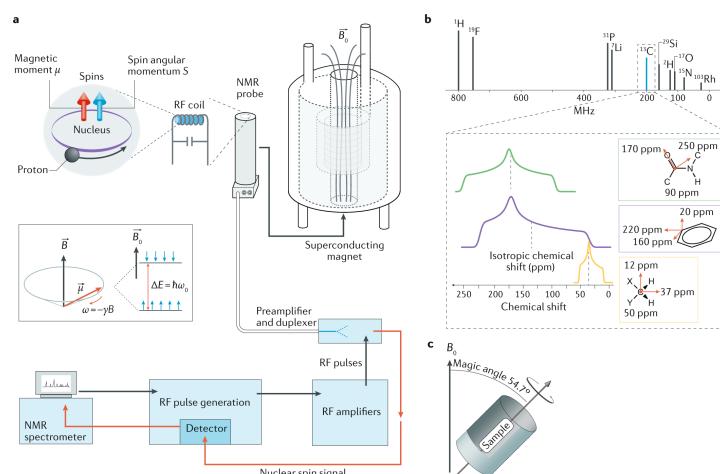


Figure 6: Schematica rappresentazione del funzionamento dello strumento

Gli esperimenti di spettroscopia NMR allo stato solido sono stati registrati su due spettrometri Bruker Avance II, uno operante a una frequenza di Larmor di ^1H pari a 700 MHz (16,4 T), corrispondente a una frequenza di Larmor di ^{13}C pari a 176 MHz, e l'altro a una frequenza di Larmor di ^1H pari a 700 MHz (18,8 T) corrispondente a una frequenza di Larmor di ^{13}C pari a 201 MHz. Gli spettrometri erano equipaggiati con una sonda MAS BVT da 3,2 mm (800 MHz) e da 4 mm (700 MHz) in modalità a doppia risonanza. La frequenza di rotazione all'angolo magico (MAS) del campione è stata impostata a 11.111 kHz.

Per gli esperimenti monodimensionali ^1H - ^{13}C , il tempo di contatto della cross-polarizzazione è stato variato da 200 μs a 2000 μs ; gli spettri sono stati coprocessati utilizzando MCR. Per gli esperimenti bidimensionali ^1H - ^{13}C HETCOR, la cross-polarizzazione è stata ottenuta soddisfacendo la condizione di Hartmann-Hahn per $k = 1$. Le finestre spettrali per ^1H e ^{13}C erano pari rispettivamente a 20 e 250 ppm. Il tempo di contatto della cross-polarizzazione è stato variato da 200 μs a 2000 μs . Durante l'evoluzione della magnetizzazione di ^1H sotto lo spostamento chimico nella dimensione indiretta, è stata utilizzata la sequenza di decoupling PMLG per sopprimere gli accoppiamenti dipolari ^1H - ^1H . In questi esperimenti, il tempo di rilassamento tra una scansione e la successiva (interscan delay) è stato impostato a 1 s.

In particolare sono stati analizzati con lo spettrometro a 700 MHz:

- Entrambi i campioni di *Polistes dominula*
- Entrambi i campioni di *Polistes gallicus*

Mentre con lo spettrometro a 800 MHz sono stati analizzati:

- Il campione più recente *Polistes dominula*
- Vespa crabro - celle interne e involucro esterno
- Vespula - celle interne e involucro esterno

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 della cellulosa presenti in letteratura [13], che sono stati determinati proprio con uno strumento a 700 MHz.

2.3 RISULTATI E SPETTRI OTTENUTI

Nelle figure sottostanti sono riportati gli spettri monodimensionali dei diversi campioni registrati con un tempo di contatto di 200 μs e 700 μs . Mentre invece sono stati riportati gli spettri bidimensionali solo dei campioni di *Polistes dominula*, *Polistes gallicus* e l'involucro di *Vespula vulgaris*. Questi spettri riportati corrispondono ad un tempo di contatto di 2000 μs .

2.3.1 Spettri monodimensionali

Negli spettri monodimensionali riportati di seguito sono evidenziate tre differenti zone dello spettro. La zona in rosso fa riferimento al segnale del gruppo carbonilico delle proteine, altro segnale proteico è messo in evidenza nella zona evidenziata in giallo, infine in blu è mostrata la zona che fa riferimento al segnale dei carboni della cellulosa.

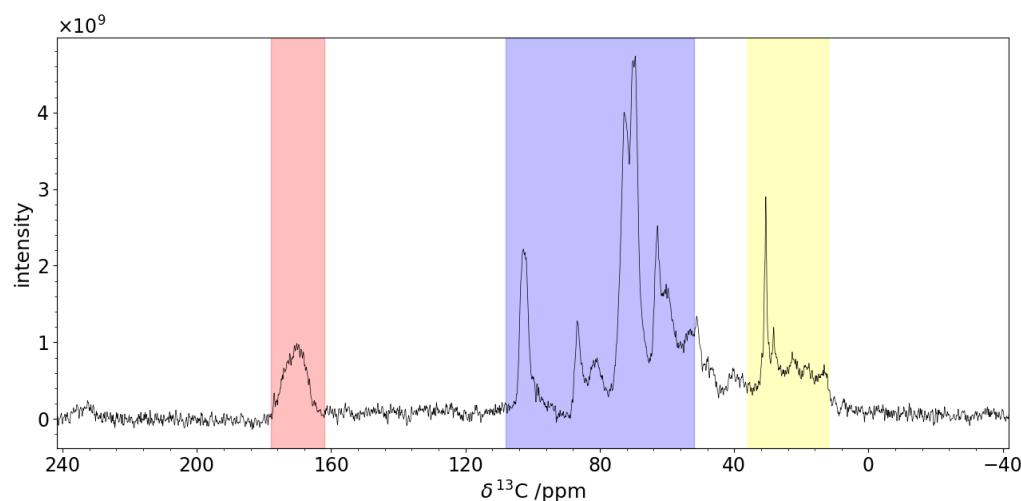


Figure 7: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vecchio di *Polistes dominula* (700MHz)

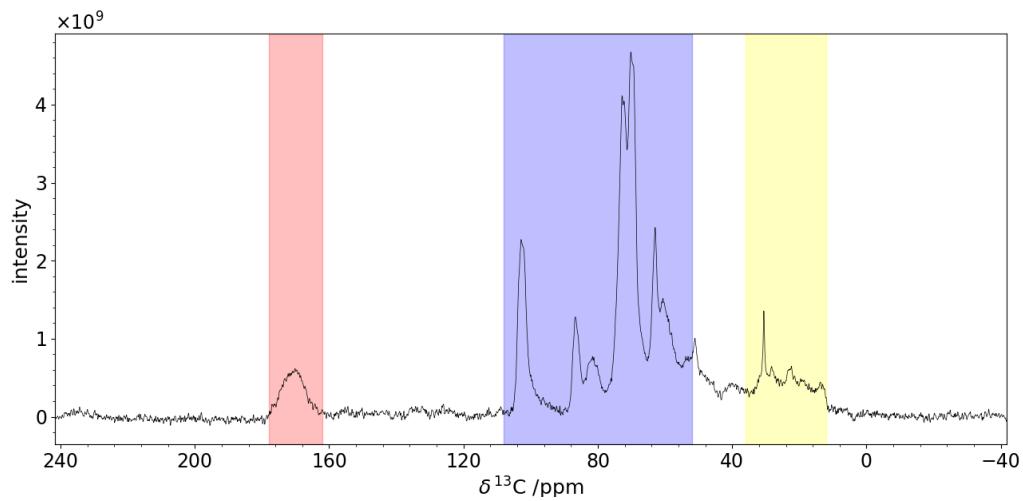


Figure 8: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di *Polistes dominula* (800MHz)

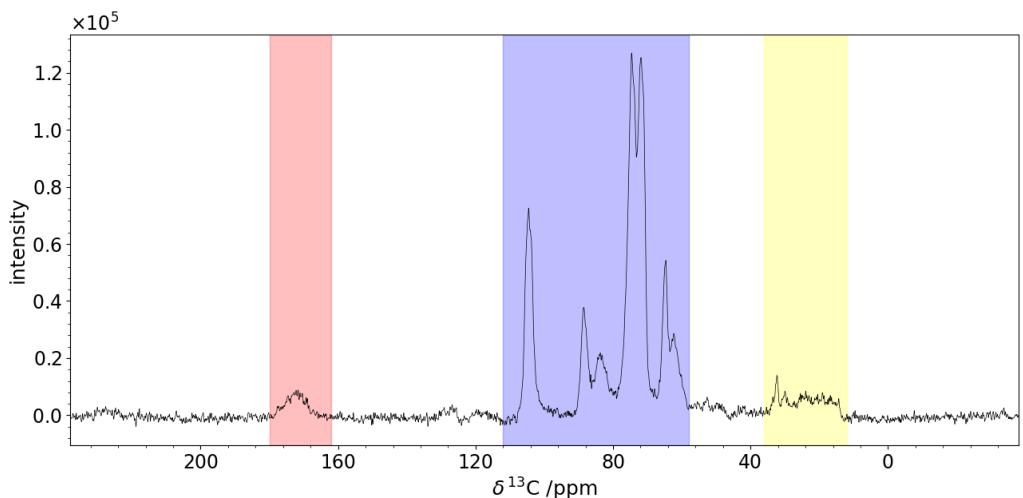


Figure 9: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di *Polistes dominula* (800MHz)

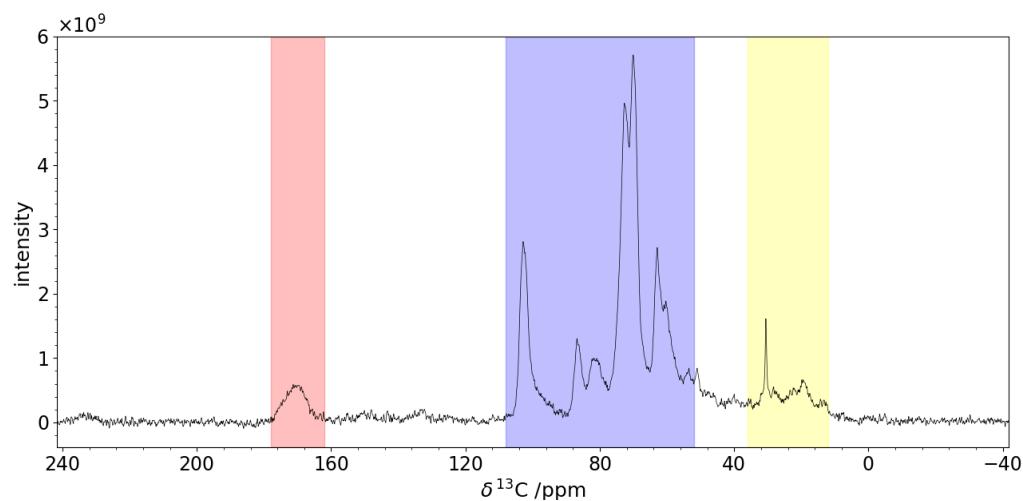


Figure 10: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più vecchio *Polistes gallicus* (700MHz)

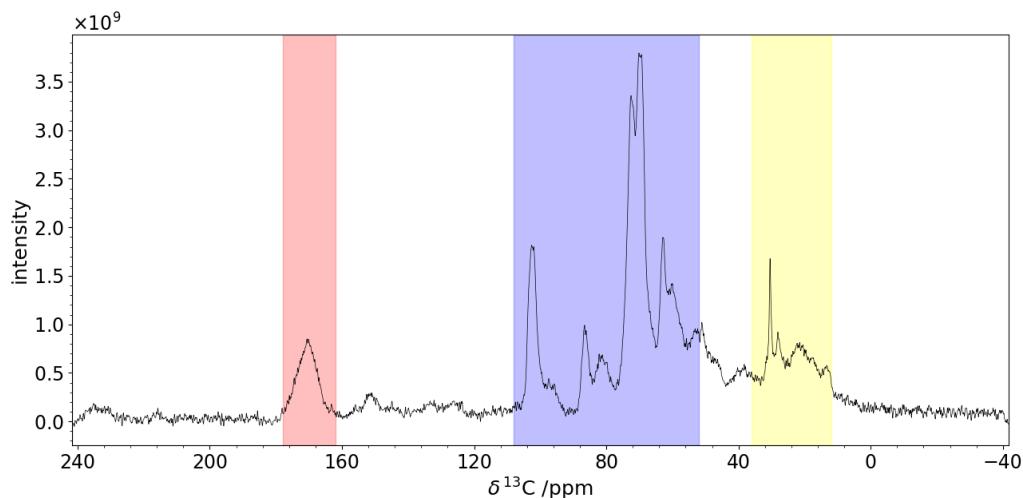


Figure 11: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR del campione più nuovo di *Polistes gallicus* (700MHz)

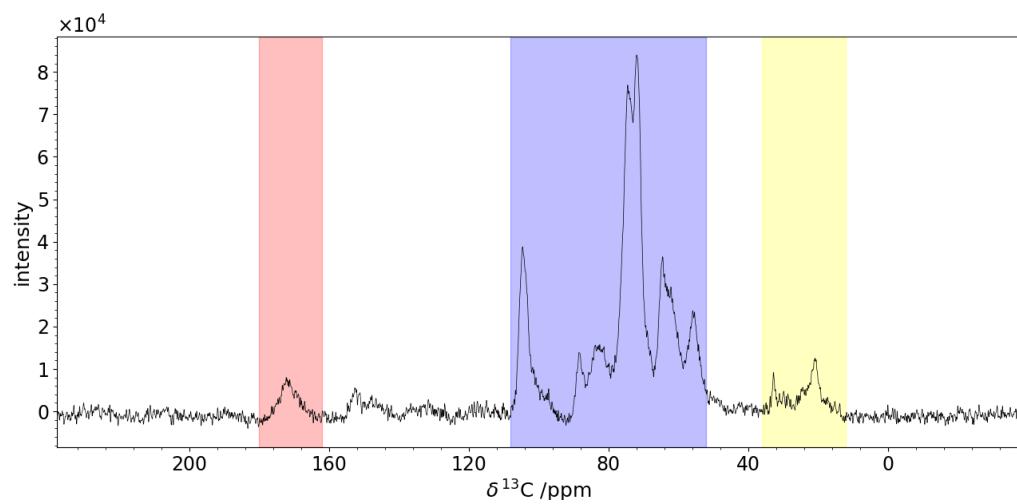


Figure 12: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR delle celle di Vespa crabro (800MHz)

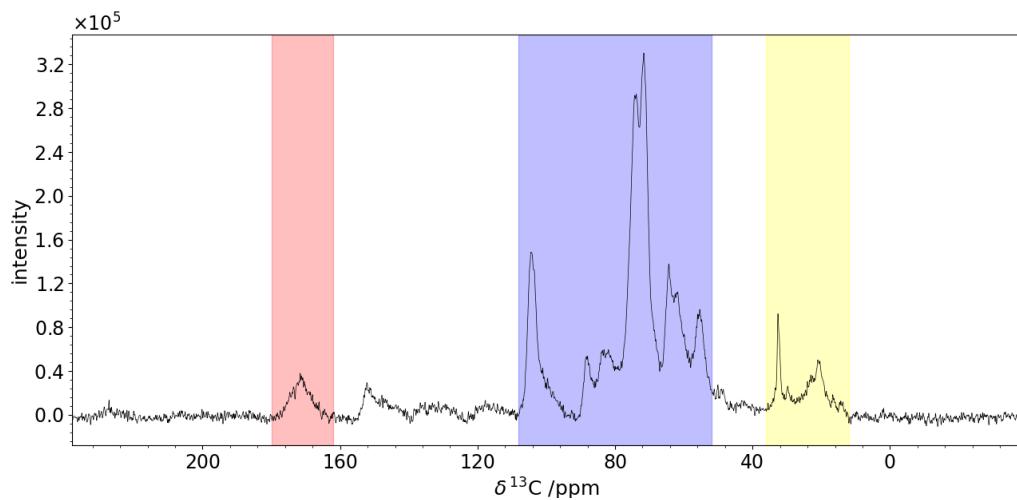


Figure 13: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di Vespa crabro (800MHz)

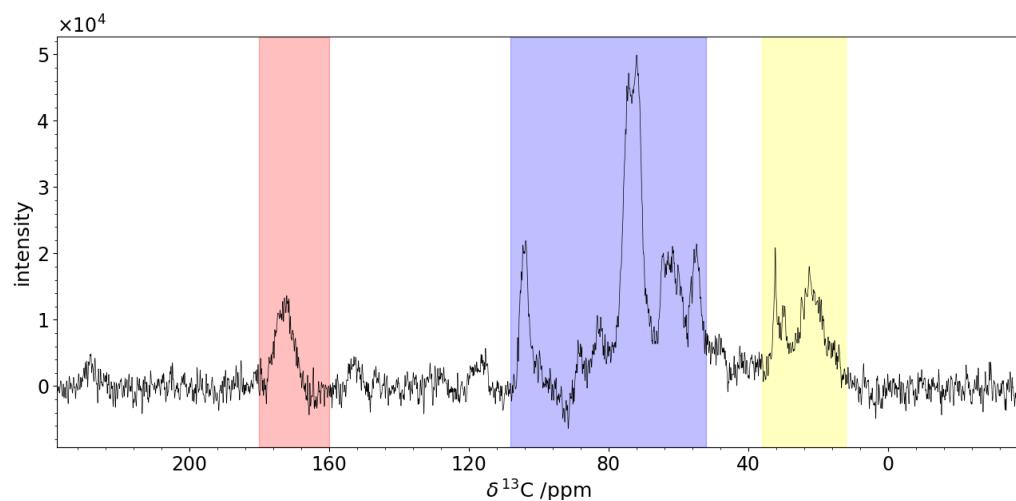


Figure 14: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR delle celle di *Vespula vulgaris* (800MHz)

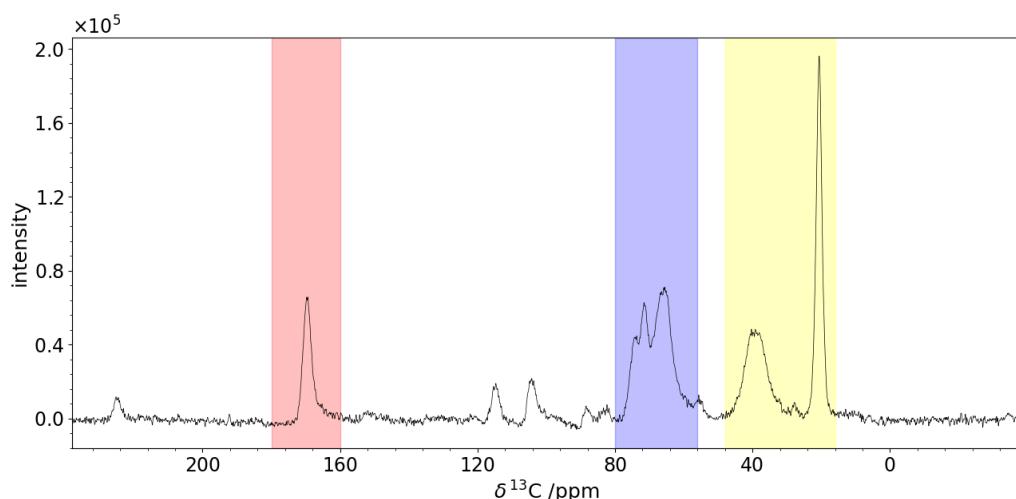


Figure 15: Spettro ^{13}C CP/MAS NMR dell'involucro di *Vespula vulgaris* (800MHz)

Quest'ultimo spettro è quello che ha destato un maggiore interesse nell'assegnazione dei segnali. La componente cellulosa è molto più scarsa se confronta agli altri spettri, le bande che si osservano nella zona in blu sono anche dovute al segnale della chitina, e si osserva nella zona in cui si ha segnale proteico due bande distinte che non fanno riferimento a proteine. Questi due segnali sono stati successivamente interpretati e sono stati assegnati a una componente lipidica (acidi grassi) e chitina.

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.

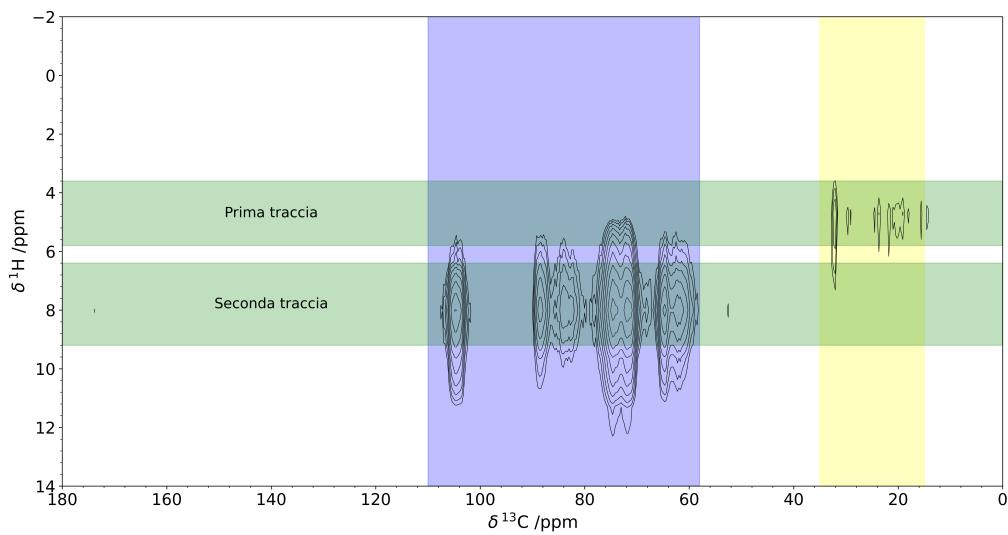


Figure 16: Spettro bidimensionale *Polistes dominula*

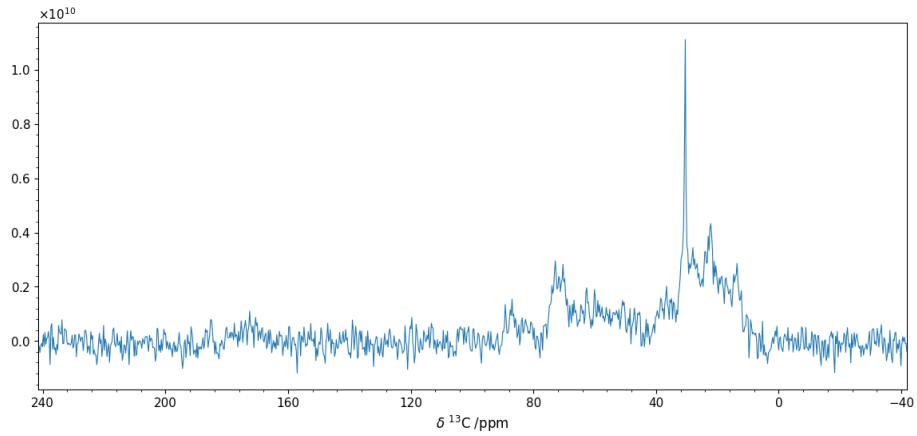


Figure 17: Prima traccia del segnale del protone

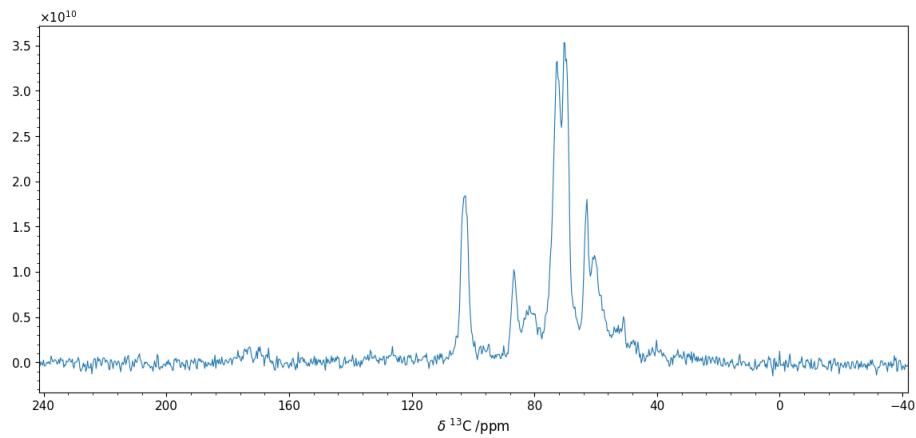


Figure 18: Seconda traccia del segnale del protone *Polistes dominula*

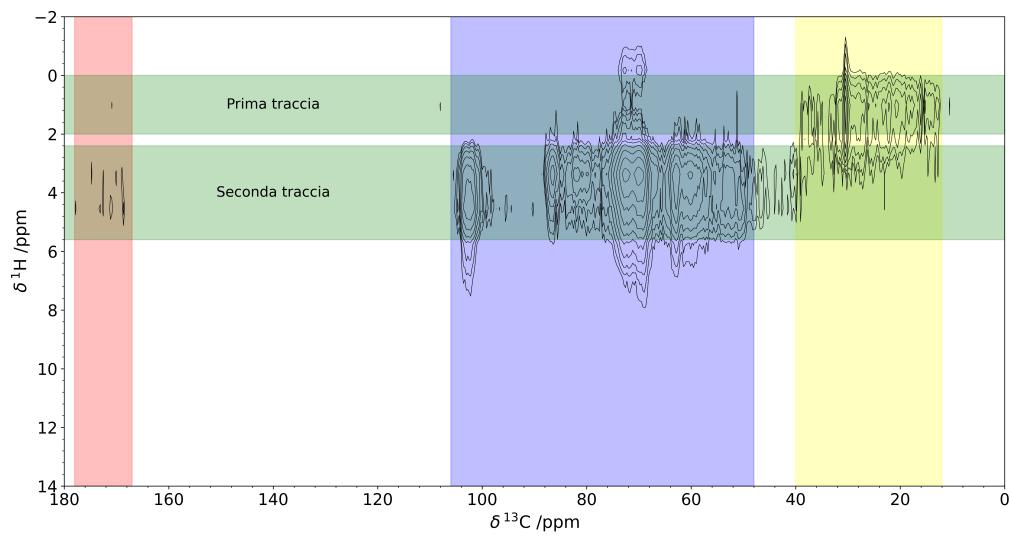


Figure 19: Spettro bidimensionale *Polistes gallicus*

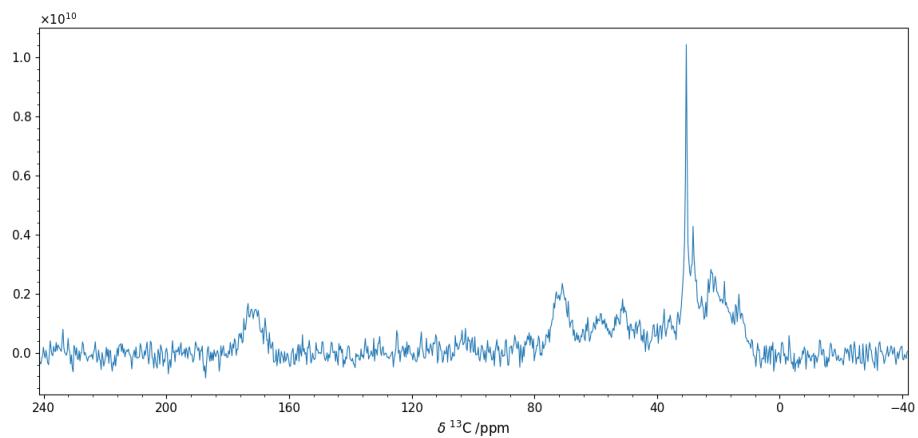


Figure 20: Prima traccia del segnale del protone *Polistes gallicus*

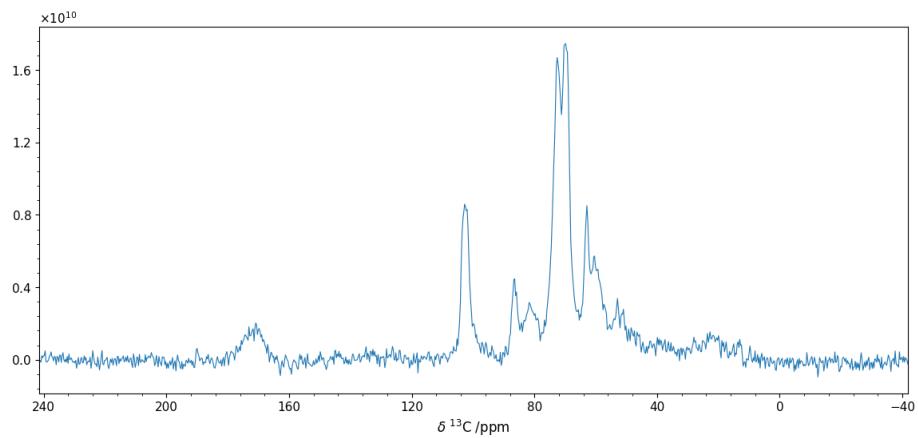


Figure 21: Seconda traccia del segnale del protone *Polistes gallicus*

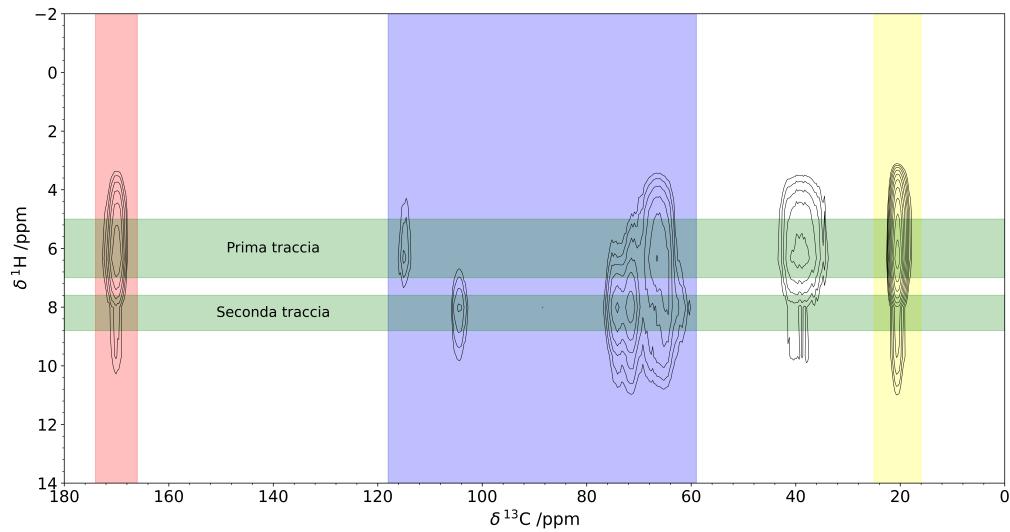


Figure 22: Spettro bidimensionale *Vespa vulgaris*

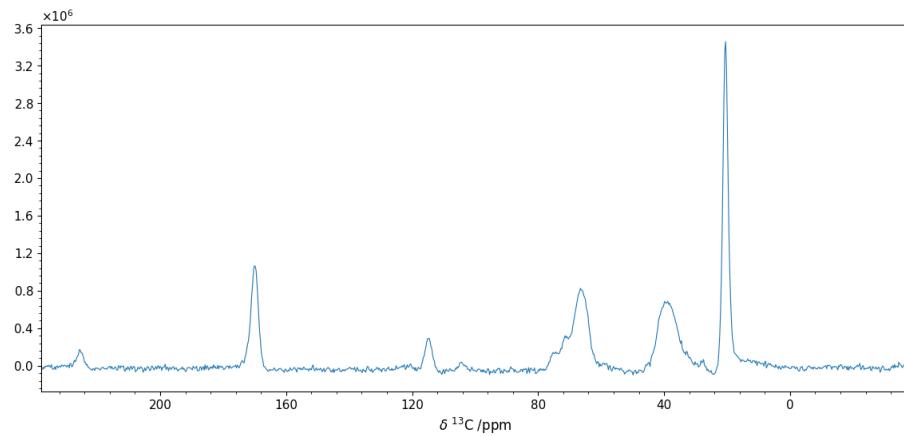


Figure 23: Prima traccia del segnale del protone *Vespa vulgaris*

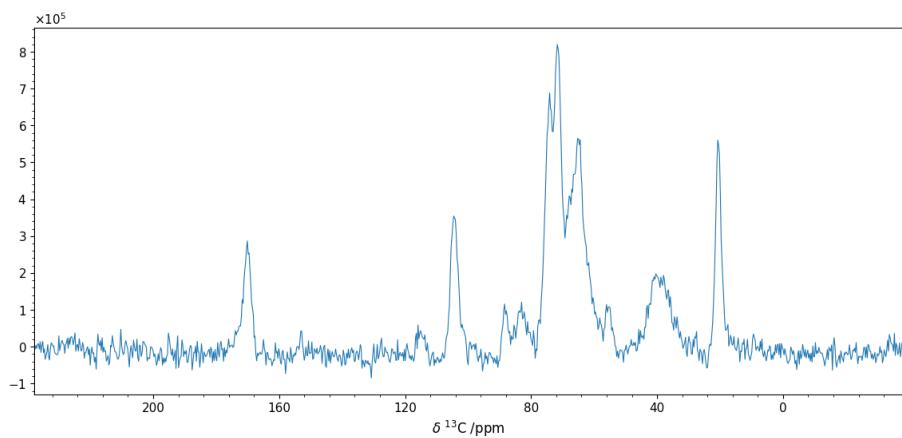


Figure 24: Seconda traccia del segnale del protone *Vespa vulgaris*

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.

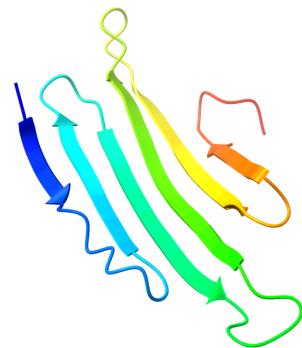


Figure 25: Struttura della proteina 03231 eliminando la porzione ad alfa elica

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

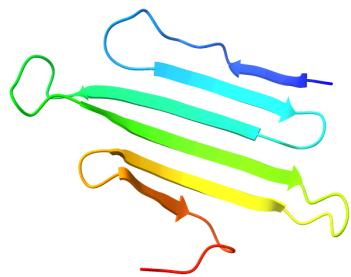


Figure 26: Struttura della proteina 08705 eliminando la porzione ad alfa elica

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:

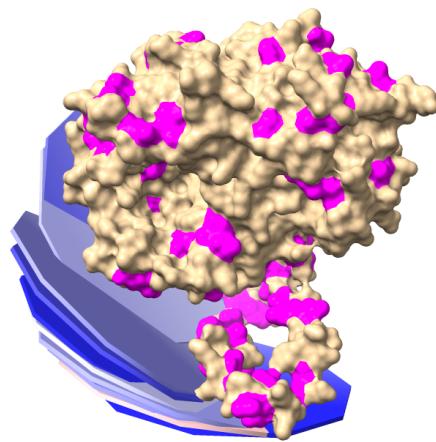


Figure 27: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalle superficie azzurre attorno alla proteina 10508

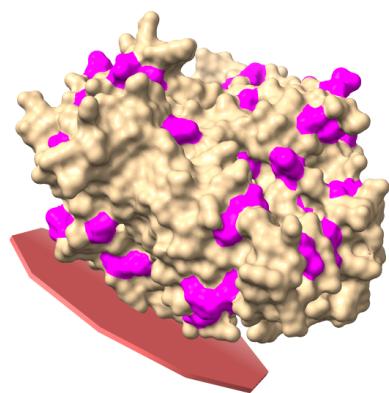


Figure 28: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 04156

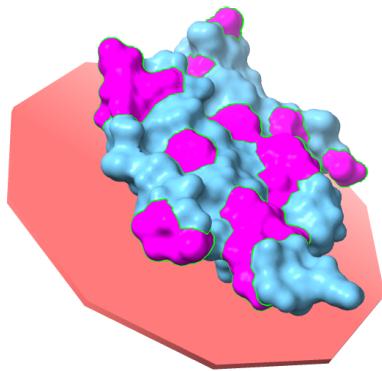


Figure 29: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 08705

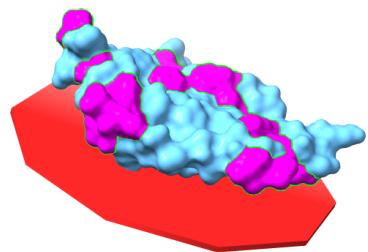


Figure 30: Simulazione del comportamento della cellulosa rappresentata dalla superficie rossa sottostante alla proteina 03231

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:

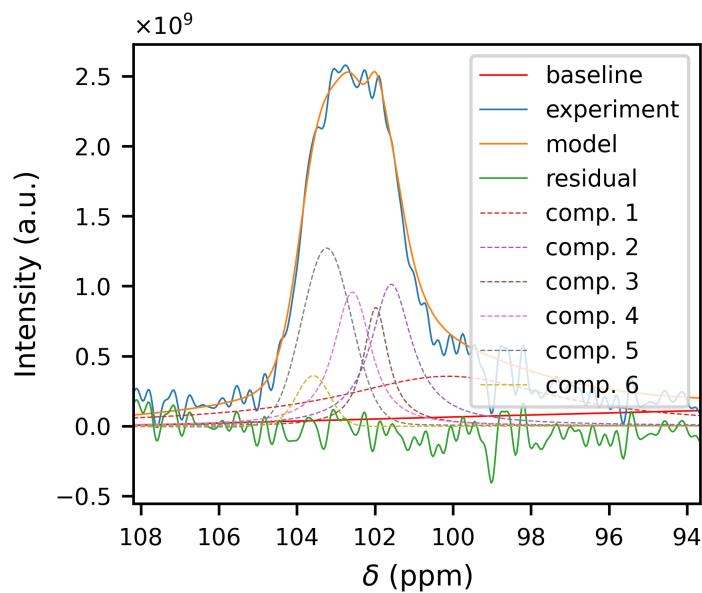


Figure 31: Fit zona C1

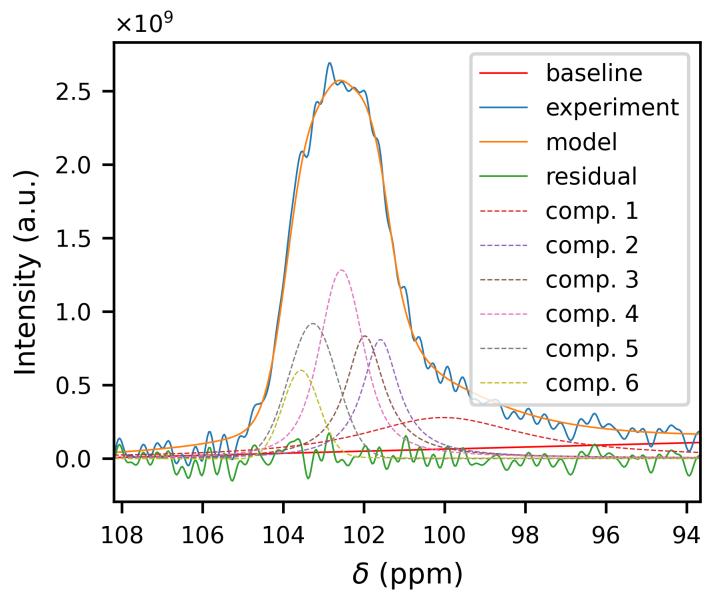


Figure 32: Fit zona C1

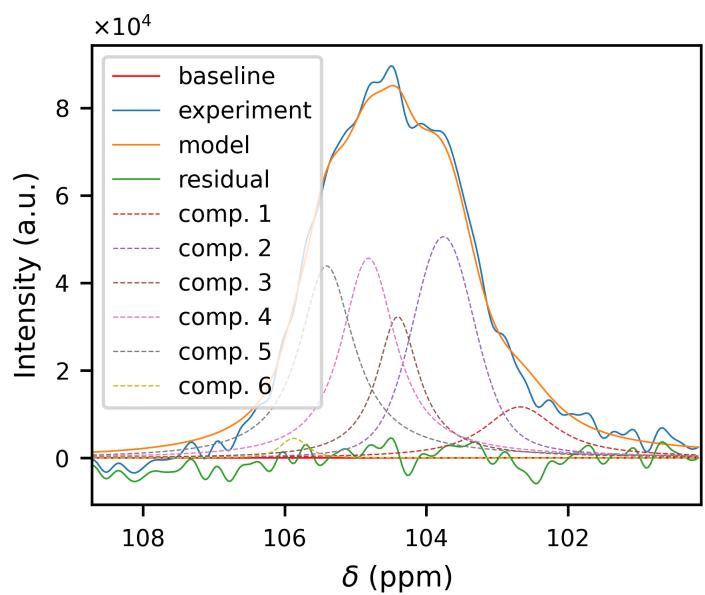


Figure 33: Fit zona C1

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

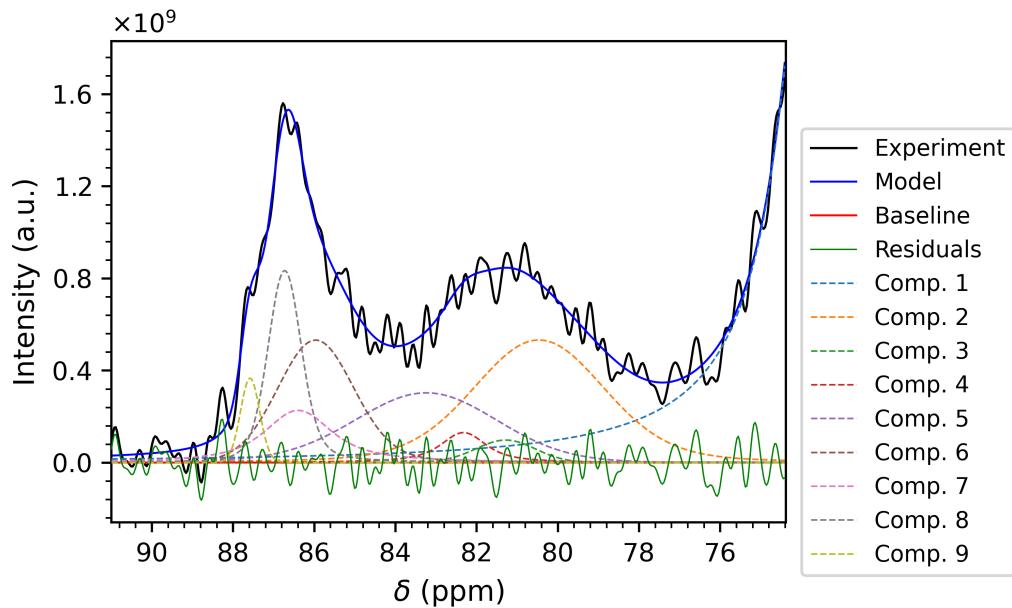


Figure 34: Fit zona C4

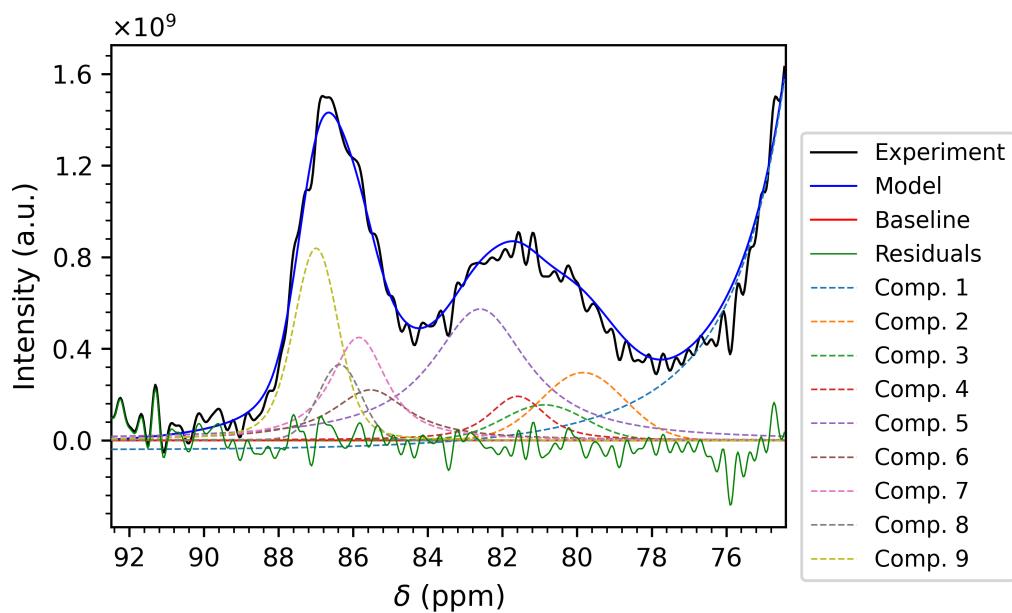


Figure 35: Fit zona C4

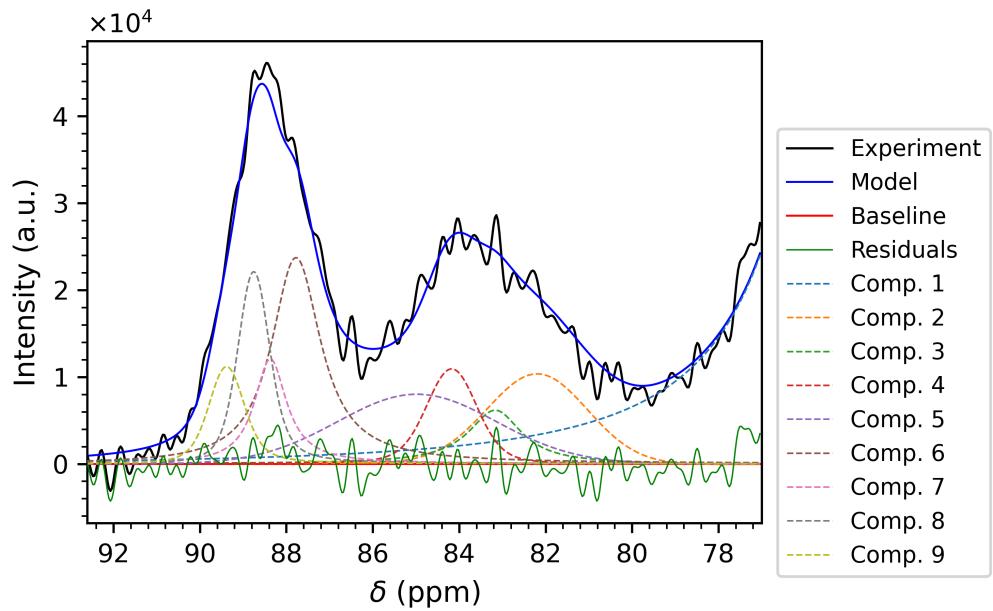


Figure 36: Fit zona C4

3.2.2 *Polistes gallicus*

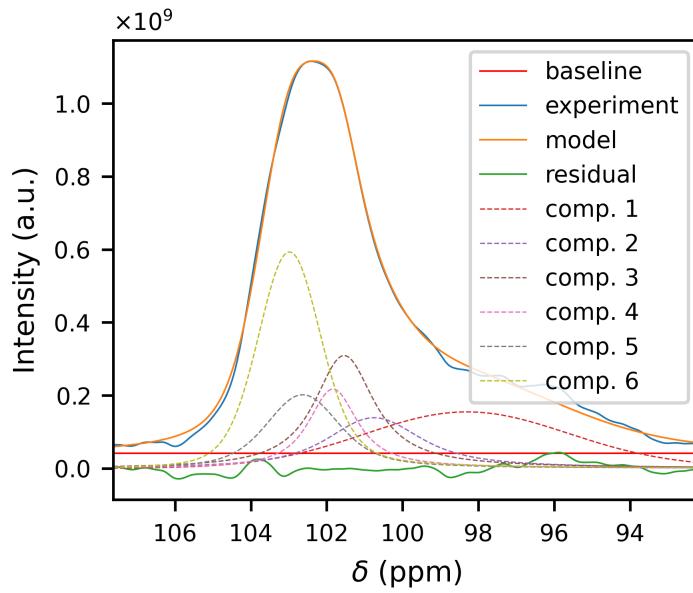


Figure 37: Fit zona C1

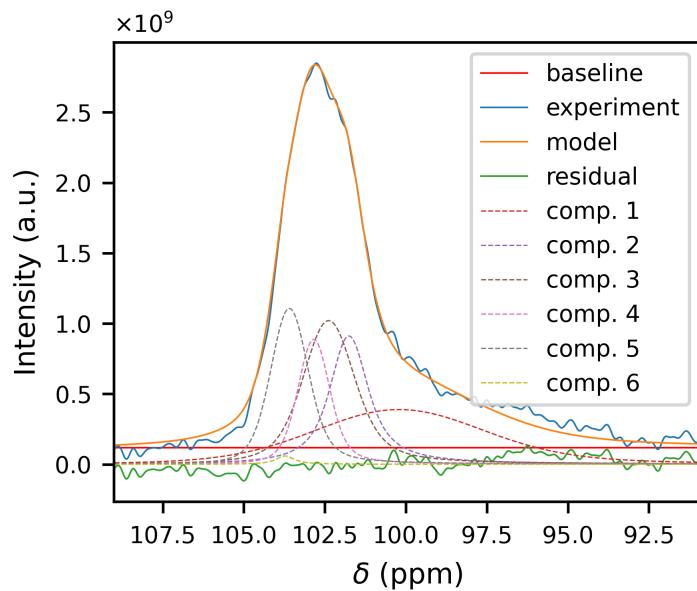


Figure 38: Fit zona C1

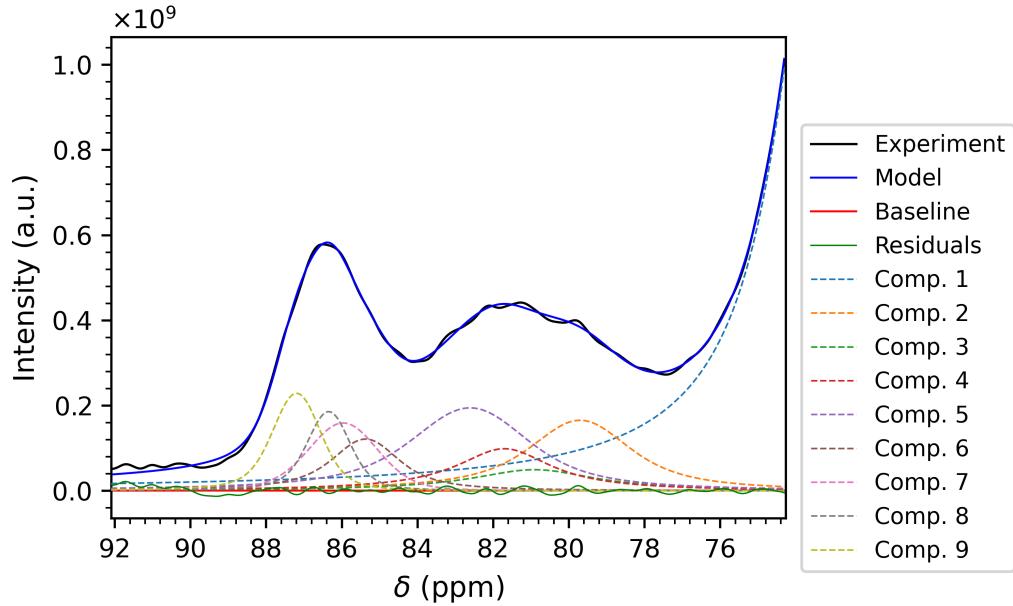


Figure 39: Fit zona C4

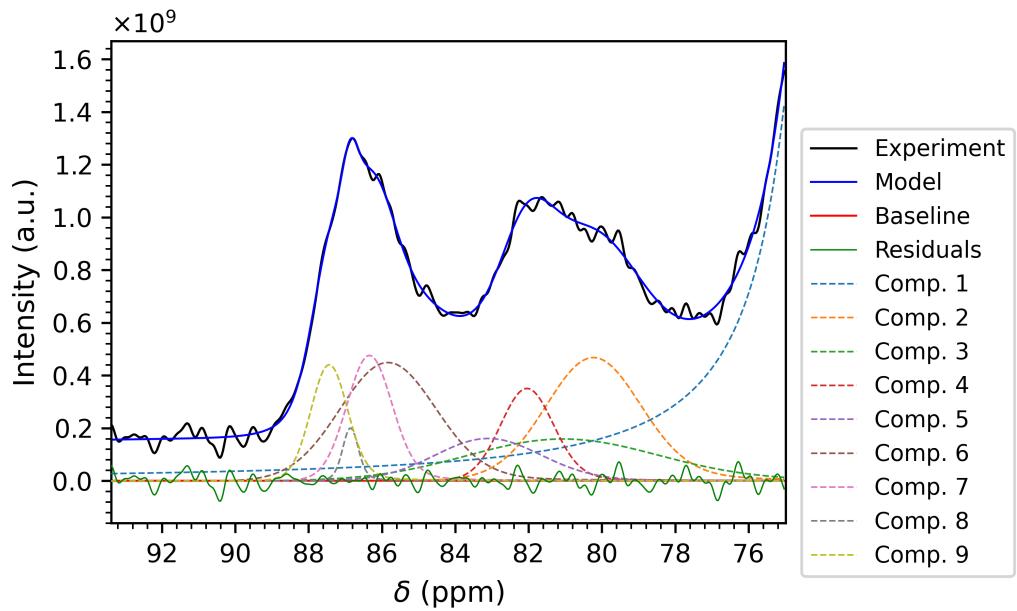


Figure 40: Fit zona C4

3.2.3 *Vespa crabro*

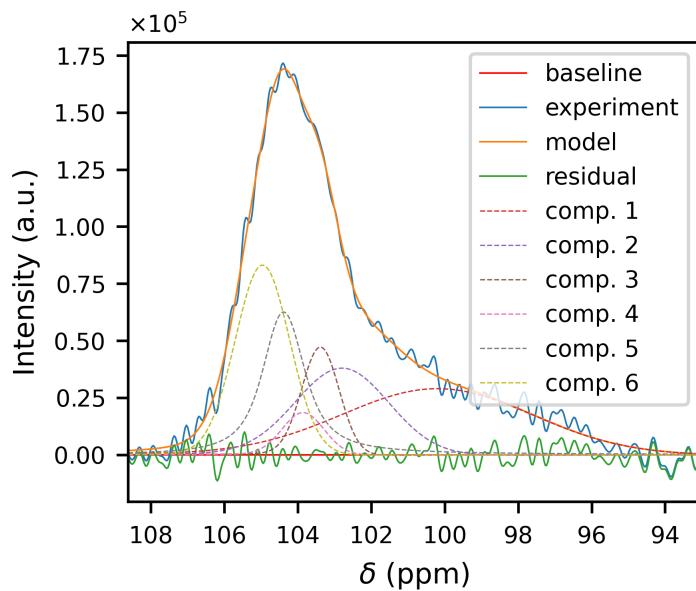


Figure 41: Fit zona C1

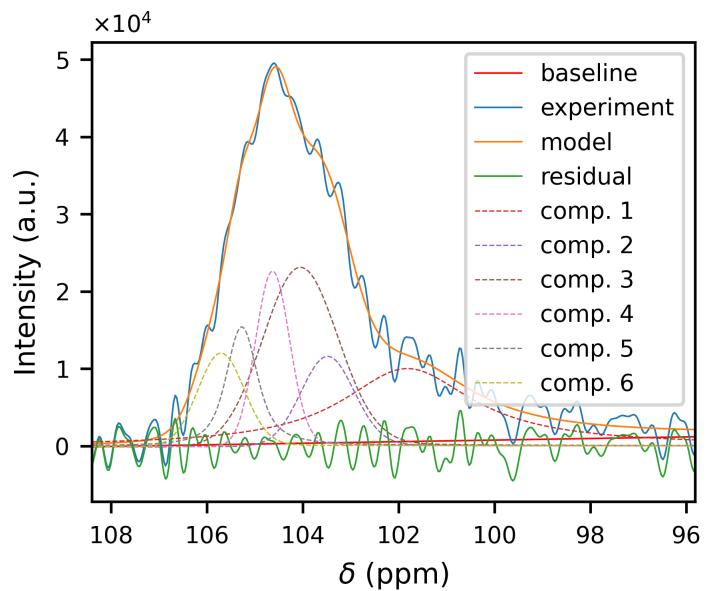


Figure 42: Fit zona C1

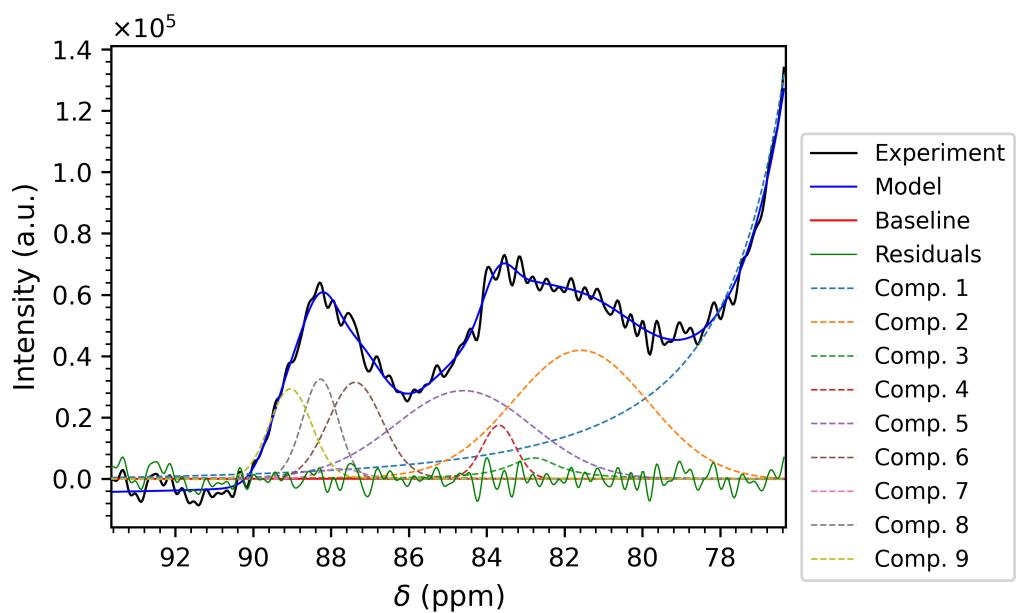


Figure 43: Fit zona C4

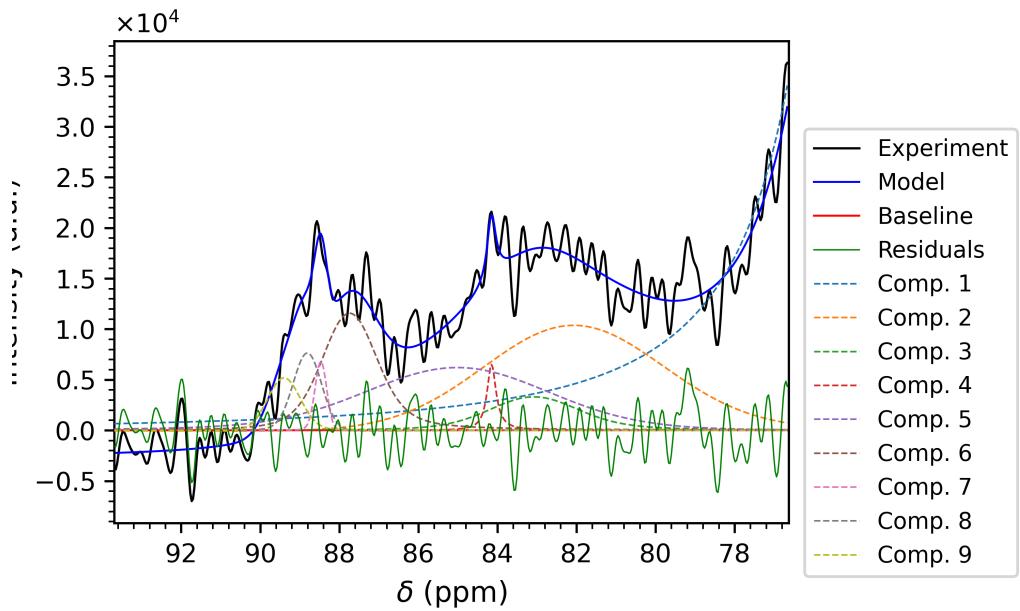


Figure 44: Fit zona C4

3.2.4 *Vespula vulgaris*

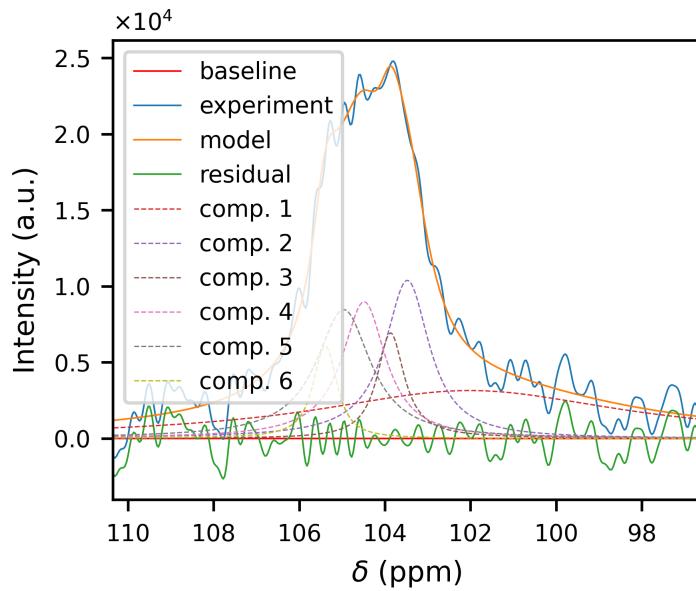


Figure 45: Fit zona C4

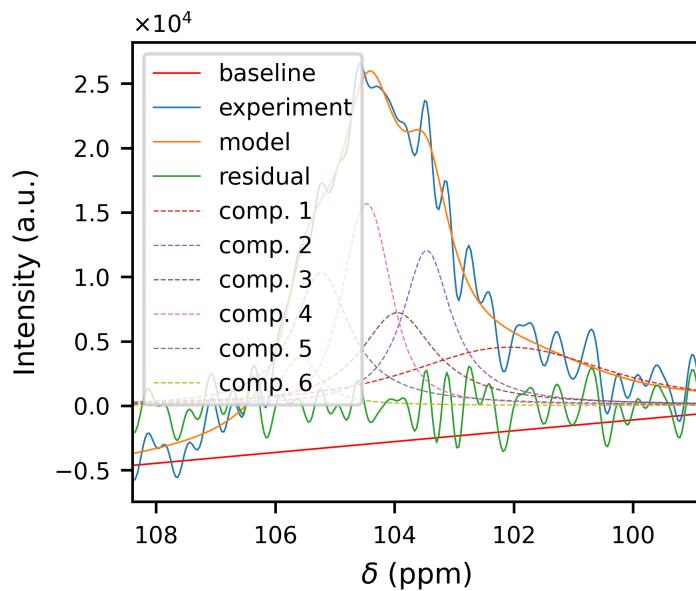


Figure 46: Fit zona C4

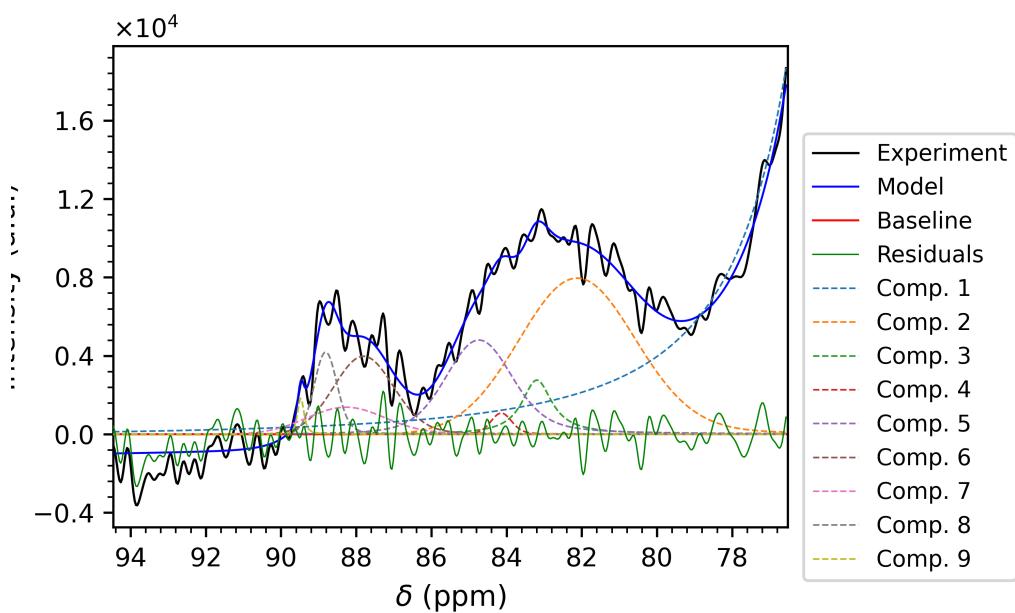


Figure 47: Fit zona C4

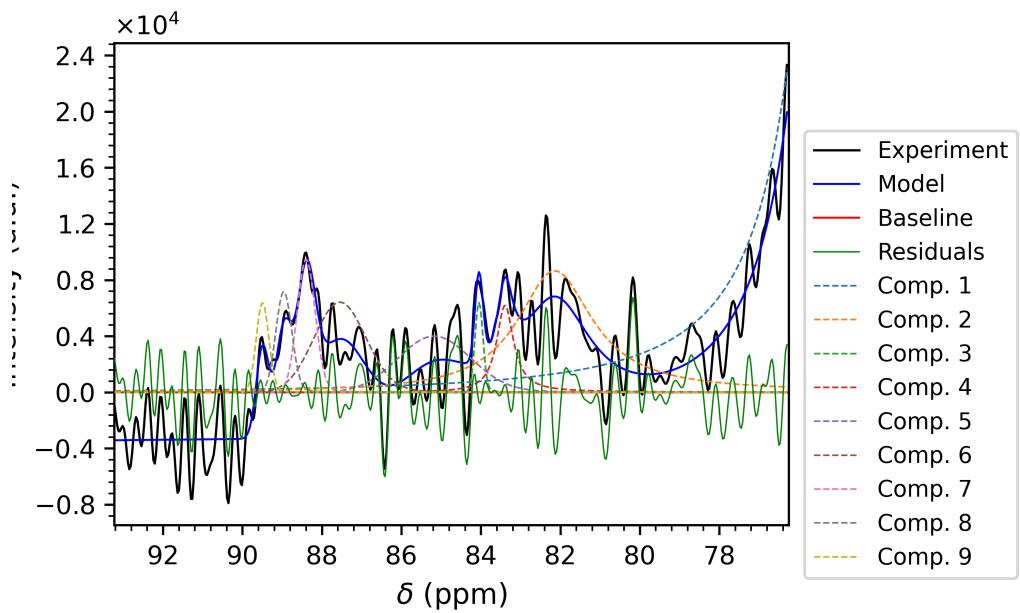


Figure 48: Fit zona C4

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. [14]

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.

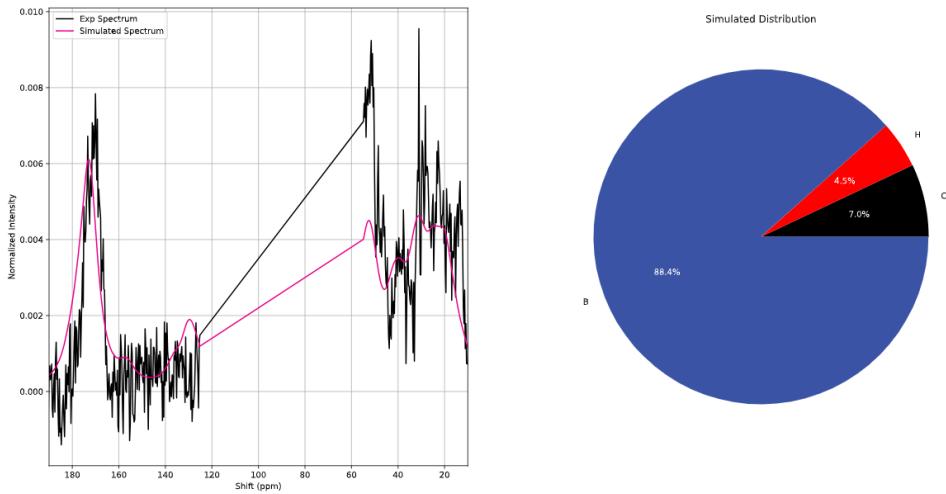


Figure 49: Predizione del segnale proteico sullo spettro di *Polistes dominula*

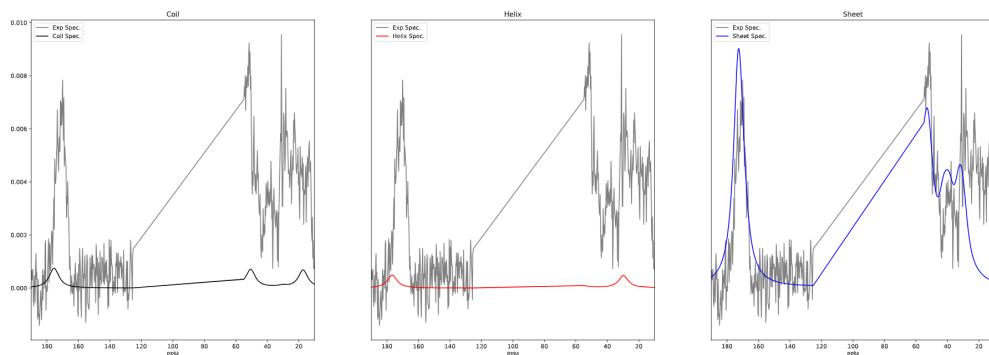


Figure 50: Contribuzione del segnale da parte delle differenti strutture secondarie

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 [11], che appunto presentavano una

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

4

CONCLUSIONI E OSSERVAZIONI FINALI

Nel presente lavoro sono stati analizzati la composizione chimica e l'assetto strutturale dei nidi di diverse specie *Polistes dominula*, *Polistes gallicus*, *Vespula vulgaris* e *Vespa crabro* mediante spettroscopia NMR allo stato solido e valutazioni complementari. L'insieme dei dati raccolti permette di evidenziare come specie anche morfologicamente o ecologicamente affini adottino strategie di nidificazione e scelte di materiali profondamente diverse, riflettendo adattamenti specifici al loro ambiente, alle abitudini di costruzione e ai vincoli selettivi che caratterizzano ciascuna specie.

Per le specie del genere *Polistes* le analisi NMR hanno mostrato, oltre all'elevata presenza di cellulosa, una grande eterogeneità strutturale relativa a soprattutto a quest'ultima; con segnali associati a porzioni cellulose amorfe e cristalline. Questa complessità molecolare e la relativa abbondanza di materiale proteico si traduce in un materiale leggero ma sorprendentemente resistente alla trazione e agli agenti climatici, caratteristiche in linea con le abitudini di nidificazione con il ruolo ecologico di queste specie. Realizzando nidi in ambienti esposti a predatori e agenti atmosferici, considerando anche che queste specie non sviluppano involucri protettivi, si presenta la forte necessità di avere nidi nel complesso molto resistenti, influenzando quindi i materiali utilizzati.

Un quadro molto diverso emerge per i generi *Vespula* e *Vespa*, che realizzano nidi chiusi e multilivello racchiusi da un involucro esterno. Anche per queste specie si osservano relazioni importanti tra la struttura nei nidi e caratteristiche sociali. Per le celle e involucro esterno di *Vespa crabro* non si osserva una particolare distinzione a livello di composizione, i nidi realizzati da queste specie sono poi in genere molto più fragili rispetto agli altri analizzati. Durante la preparazione del campione si è osservata la facilità con cui si riusciva a sbriciolare il nido, questa relativa fragilità è data dalla scelta dei siti in cui nidificare, protetti o poco esposti, questo è il fatto che *Vespa crabro* non si deve difendere da predatori fa sì che

non ci sia una marcata esigenza nella costruzione di favi resistenti. Per *Vespula vulgaris* il discorso è differente, anche loro realizzano nidi in luoghi non esposti con celle poco resistenti; tuttavia il fatto che queste specie nidificano sottoterra fa sì che l'involucro debba avere una determinata composizione. Si è osservato infatti una nitevole differenza nella struttura tra le celle interne e l'esterno, con un involucro ricco di chitina e molto robusto, se confrontato con le celle o con l'involucro di *Vespa crabro*.

Le simulazioni delle possibili interazioni tra cellulosa e proteine suggeriscono un'organizzazione del materiale in cui domini cellulosici possono associarsi a superfici proteiche tramite interazioni deboli, contribuendo alla stabilità del nido. Sebbene preliminari, queste analisi forniscono indicazioni utili per comprendere come le componenti organiche possano cooperare nel determinare le proprietà macroscopiche della carta delle vespe.

In conclusione, questo studio mette in evidenza come la chimica del materiale di costruzione e la biologia delle specie siano strettamente interconnesse: la microstruttura riflette l'ecologia della specie, e la selezione del materiale, così come la sua rielaborazione, rappresentano un tratto adattativo fondamentale nella storia evolutiva dei Vespidae. L'approccio integrato basato sulla spettroscopia a stato solido si dimostra quindi uno strumento efficace per investigare questi biocompositi naturali.

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] Satoshi Hozumi, Sôichi Yamane, and Sidnei Mateus. Thermal characteristics of the mud nests of the social wasp polybia spinifex (hymenoptera; vespidae). *Sociobiology Vol. 53, No. 1, 2009*, 53, 03 2009.
- [10] R. Jeanne. The adaptiveness of social wasp nest architecture. *Quarterly Review of Biology - QUART REV BIOL*, 50, 09 1975.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Adrien Perrard. Wasp waist and flight: Convergent evolution in wasps reveals a link between wings and body shapes. *The American Naturalist*, 195, 10 2019.
- [16] E Schmolz, N Brüders, R Daum, and Ingolf Lamprecht. Thermoanalytical investigations on paper covers of social wasps. *Thermochimica Acta*, 361:121–129, 10 2000.

- [17] 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.
- [18] Stanford–Brown–Spelman iGEM Team. Material waterproofing, 2014. Content & Development © Stanford–Brown–Spelman iGEM 2014.