

## *N*-acil-homosserina lactonas de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) e seu *quorum quenching* por enzimas de *Bacillus cereus*

Francisca Diana da Silva Araújo<sup>1</sup> (PG), Luciana Maria Ramires Esper<sup>2</sup> (PQ), Arnaldo Yoshiteru Kuaye<sup>2</sup> (PQ), Marcelo Palma Sircili<sup>3</sup> (PQ), Anita Jocelyne Marsaioli<sup>1</sup> (PQ)\*

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, 13083-970 Campinas, SP, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 13083-862 Campinas, SP, Brasil; <sup>3</sup>Instituto Butantan, Laboratório de Bacteriologia, 05503-900, São Paulo, Brasil. anita@iqm.unicamp.br

Palavras Chave: *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, *quorum quenching*

### Introdução

A comunicação célula-célula ou *quorum sensing* é um fenômeno de transdução de sinais que pode modular algumas funções celulares. A regulação desse sistema é mediada pelo acúmulo de uma classe ou mais de moléculas sinalizadoras produzidas pela célula e excretadas para o meio externo. A quebra desse sistema de comunicação é denominada *quorum quenching*.

O objetivo deste trabalho foi identificar a ocorrência de *quorum sensing* e *quorum quenching* em duas bactérias patogênicas de grande interesse na indústria de alimentos, *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp) e *Bacillus cereus*, as quais tem sido associadas com casos meningite em neonatos.<sup>1,2</sup>

### Resultados e Discussão

O estudo químico do meio de cultivo da bactéria *E. sakazakii* resultou na identificação de três acil-homosserina lactonas (AHL): (S)-*N*-heptanoil-HSL, (S)-*N*-dodecanoil-HSL e (S)-*N*-tetradecanoil-HSL. No cultivo misto de *E. sakazakii* e *B. cereus* observou-se a redução e/ou a não detecção das AHLs produzidas por *E. sakazakii*, resultado este que pode estar associado ao fenômeno *quorum quenching*, provavelmente promovido pelas enzimas AHL lactonase e AHL acilase do *B. cereus*.<sup>3</sup> Para detectar a ação destas enzimas foi realizada uma biocatálise utilizando células de *B. cereus* de duas diferentes cepas (ATCC 14579 e CCT 4060), e (S)-*N*-dodecanoil-HSL como substrato. A biorreação foi desenvolvida em solução tampão (pH 7), por um período de 3 h, seguido da extração com acetato de etila e monitoramento por ESI-MS-MS, em modo negativo.

A biorreação com *B. cereus* CCT 4060 e (1) produziu (2) com íon quasi-molecular (M-H) em *m/z* 300,2183, indicando que 18 u.m.a. foram acrescentados à (S)-*N*-dodecanoil-HSL pela ação enzimática. Isto está de acordo com a *N*-dodecanoil-homosserina, confirmando a presença de AHL lactonase. Adicionalmente, os íons quasi-moleculares em *m/z* 199,1702 e 118,0507 revelaram a formação de ácido dodecanóico (3) e homosserina

(4), respectivamente, que são produtos esperados da reação enzimática de AHL acilase sobre a (S)-*N*-dodecanoil-homosserina. A lactonase de *B. cereus* ATCC 14579 não foi ativa como *B. cereus* CCT 4060 e a atividade da AHL acilase não foi detectada em nosso experimento de 3 horas.

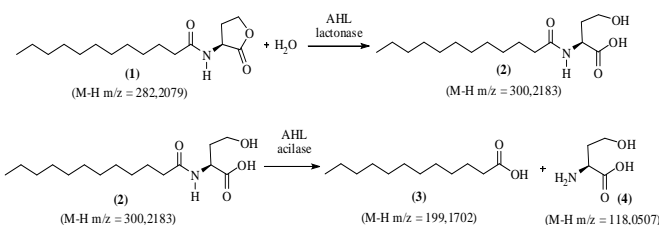


Fig. 4. Origem esquemática de 2, 3 e 4.

### Conclusões

Este trabalho revelou que a cepa de *E. sakazakii* produz (S)-*N*-heptanoil-HSL, (S)-*N*-dodecanoil-HSL e (S)-*N*-tetradecanoil-HSL, resultado não reportado anteriormente na literatura. A identificação e caracterização destas estruturas foram a primeira e importante etapa deste trabalho, contudo mais pesquisas são necessárias para identificar as funções reguladas pelas AHLs em *E. sakazakii*. O presente trabalho também possibilitou a evidência da inibição da comunicação célula-célula, mediada por AHL, de uma bactéria Gram-negativa (*E. sakazakii*) durante sua associação com uma Gram-positiva (*B. cereus*). Este fenômeno foi investigado revelando uma reação enzimática em cascata com uma lactonase e acilase em operação sincronizada responsáveis pelo *quorum quenching* de *B. cereus*, levando à interrupção do sistema de comunicação via AHL. Este mecanismo de *quorum quenching* pode trazer grandes benefícios, bloqueando fenótipos e funções reguladas por *quorum sensing*. Finalmente, este é o primeiro trabalho em que acilase de *B. cereus* está associada com o mecanismo de degradação de AHL.

### Agradecimentos

CNPq, CAPES, Instituto de Química da Unicamp, ANP e Petrobrás.

<sup>1</sup> C. Iversen, and S. Forsythe, *S. Trends Food Sci. Technol.*, 2003, **14**, 443.

<sup>2</sup> E. M. Crielly, N. A. Logan, and A. Anderton, *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, **77**, 256.

<sup>3</sup> R. Czajkowski, and S. Jafra, *Acta Biochim. Pol.*, 2009, **56**, 1.