

ANA PAULA PELLEGRINO

**"TRANSFORMAÇÃO DA PLANTA
MEDICINAL *Artemisia annua* L."**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de Biologia Vegetal.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Simone L. Kirszenzaft Shepherd

9768000

Este exemplar corresponde à redação final

tese defendida pelo (a) candidato (a)

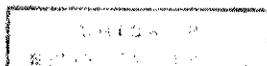
Ana Paula Pellegrino

aprovada pela Comissão Julgadora.

22/11/95: Simone L. Kirszenzaft Shepherd

CAMPINAS, SP

1995

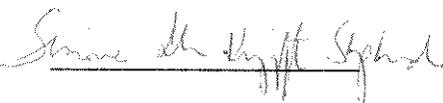


LOCAL E DATA: CAMPINAS, 22 DE NOVEMBRO DE 1995.

BANCA EXAMINADORA:

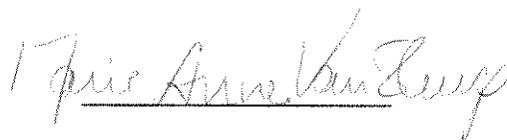
TITULARES:

Profa. Dra. SIMONE L. KIRSZENZAFI SHEPHERD (Orientador)



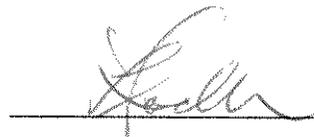
Assinatura

Profa. Dra. MARIE-ANNE VAN SLUYS



Assinatura

Prof. Dr. LADISLAV SODEK



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. ROLF DIETER ILLG



Assinatura

APROVADA

*"Se teus projetos são para um ano, semeia o grão;
Se são para dez anos, planta uma árvore;
Se são para cem anos, instrua o povo.
Semeando uma vez o grão, colherás uma vez;
Plantando uma árvore, colherás dez vezes;
Instruindo o povo, colherás cem vezes.
Se deres um peixe a um homem, ele comerá uma vez;
Se o ensinares a pescar, ele comerá a vida inteira."*

(Kuan-Tzu, sábio chinês, séc. VII a.C.)

A MEUS PAIS,

FULVIO E THEREZINHA,

dedico este trabalho.

AO CÍCERO,

PELO SEU AMOR

E PACIÊNCIA,

agradeço de coração.

À Profa. Dra. Simone L. Kirszenaft Shepherd por haver me privilegiado com sua orientação científica e com sua amizade incondicional em todos os momentos,

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys pelo apoio constante sem o qual teria sido impossível concluir este trabalho,

Aos Profs. Drs. Mary Anne Heidi Dolder, Ladislav Sodek e Rolf Dieter Illg pelas valiosas sugestões dadas por ocasião da pré-banca,

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas (CPQBA) pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho,

À Dulce Regina Joaquim pelo suporte técnico e por todo o conhecimento transmitido dentro e fora do laboratório,

À Regina Hashimoto pela atenção e ajuda nas caracterizações moleculares,

À Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder pelo acompanhamento durante a execução das análises químicas,

Aos colegas e amigos do CPQBA pelos conselhos técnicos e pela convivência pessoal,

Aos colegas de laboratório do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo pela acolhida,

À Valfarmed Distribuidora de Medicamentos Ltda. pela ajuda na edição final deste trabalho,

À CAPES pelo auxílio financeiro,

SINCEROS AGRADECIMENTOS.

ÍNDICE

	página
LISTA DE FIGURAS	VI.
LISTA DE TABELAS	VIII.
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. A malária	5
3.2. A planta <i>Artemisia annua</i> L.	12
3.2.1. Aspectos históricos	12
3.2.2. Características botânicas	13
3.2.3. Características quimiotaxonômicas	16
3.2.4. Produção de compostos anti-maláricos	17
3.3. O processo de transformação via <i>Agrobacterium</i>	22
3.3.1. As bactérias do gênero <i>Agrobacterium</i>	22
3.3.2. Propriedades gerais dos plasmídeos Ti e Ri	23
3.3.3. O processo de infecção e a manifestação dos sintomas	26

3.3.4. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> e o sistema de transformação: características particulares	31
3.3.5. Utilização das raízes transformadas para produção de metabólitos secundários	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Material vegetal	38
4.2. Material bacteriológico (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> e <i>Agrobacterium rhizogenes</i>)	38
4.2.1. Descrição do material bacteriológico utilizado	38
4.2.2. Manutenção das bactérias	39
4.2.3. Preparo das bactérias para inoculação	39
4.3. Metodologia de transformação da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L.	41
4.3.1. Esterilização das sementes de <i>Artemisia annua</i> L.	41
4.3.2. Cultivo da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L.	41

4.3.3. Preparo da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L. e inoculação com o <i>Agrobacterium</i>	44
4.3.4. Isolamento das raízes transformadas obtidas da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L.	47
4.3.5. Cultivo das raízes em meio sólido após a transformação	48
4.3.6. Cultivo das raízes em meio líquido após a transformação	51
4.4. Análises químicas	51
4.4.1. Reagentes e padrões	51
4.4.2. Instrumental utilizado	52
4.4.3. Obtenção dos extratos	52
4.4.4. Análise dos extratos por CCD (cromatografia de camada delgada)	53
4.5. Caracterização molecular das raízes de <i>Artemisia annua</i> L. transformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> cepa 8196	53
4.5.1. Reagentes e materiais	53
4.5.2. Soluções-estoque utilizadas	54
4.5.3. Extração de DNA vegetal	55
4.5.4. Estimativa da concentração de DNA obtida	56

	página
4.5.5. Digestão do DNA	57
4.5.6. Marcação radioativa da sonda	57
4.5.7. Análise do DNA por "Dot Blot"	58
4.5.7.1. Preparação da membrana	58
4.5.7.2. Hibridização da membrana	59
4.5.7.3. Lavagem da membrana e exposição	60
4.5.8. Análise do DNA por "Southern Blot"	61
4.5.8.1. Migração do DNA em gel de agarose	61
4.5.8.2. Transferência alcalina do DNA para membrana	61
4.5.8.3. Hibridização da membrana	62
4.5.8.4. Lavagem da membrana e exposição	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. Metodologia de transformação da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L.	64
5.1.1. Esterilização das sementes de <i>Artemisia annua</i> L.	64
5.1.2. Cultivo da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L.	65

5.1.3. Preparo da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L. e inoculação com o <i>Agrobacterium</i>	67
5.1.4. Isolamento das raízes transformadas obtidas da planta medicinal <i>Artemisia annua</i> L.	72
5.1.5. Cultivo das raízes após a transformação	74
5.2. Análises químicas	79
5.3. Caracterização molecular das raízes de <i>Artemisia annua</i> L. transformadas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> cepa 8196	83
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

figura	página
1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> , parasita causador da malária	8
2. A planta <i>Artemisia annua</i> L.	15
3. Rotas biossintéticas propostas para artemisinina, artenuína B e ácido artemisinínico	21
4. Mapa funcional do plasmídeo Ri de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> cepa A4	25
5. Representação esquemática do <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e do processo de colonização genética	29
6. Esquema de corte e inoculação no meio de cultura das estacas de artemisia	46
7. Plântula de <i>Artemisia annua</i> L. "in vitro" aos 4 meses de idade	66
8. Respostas de produção de raízes em estacas de <i>Artemisia annua</i> L. aos 21 e 33 dias após inoculação por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> cepa 8196	70
9. Respostas de produção de tumores em estacas de <i>Artemisia annua</i> L. aos 21 e 33 dias após inoculação por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa C58	71
10. Raízes transformadas de <i>Artemisia annua</i> L. cultivadas em meio sólido	77

figura	página
11. Raízes transformadas de <i>Artemisia annua</i> L. cultivadas em meio líquido	78
12. Eletroforese para determinação da concentração de DNA obtida após extração	85
13. Padrão de digestão do pRi8196 pelas endonucleases de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	87
14. Autoradiografia após hibridização por "Dot Blot"	89
15. Autoradiografia após hibridização por "Southern Blot"	92

LISTA DE TABELAS

tabela	página
1. Compostos secundários produzidos em culturas estabelecidas de raízes após transformação por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	37
2. Meio AT para cultivo "in vitro" de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	40
3. Meio 1 para cultivo "in vitro" de artemisia	43
4. Meio 2 para cultivo "in vitro" de artemisia	45
5. Meio 3 para cultivo "in vitro" de raízes transformadas de artemisia	49
6. Meio 4 para cultivo "in vitro" de raízes transformadas de artemisia	50
7. Respostas observadas nas estacas de <i>Artemisia annua</i> L. aos 14, 21 e 33 dias após a inoculação da extremidade basal por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	69
8. Relação entre a concentração de antibiótico e a porcentagem de crescimento em raízes transformadas de <i>Artemisia annua</i> L.	74
9. Concentrações de ácido artemisinínico detectadas em raízes normais e transformadas	82

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento das plantas medicinais e de suas aplicações vêm sendo objeto da curiosidade e de estudos do homem desde tempos bastante remotos. Muitas espécies vegetais foram e/ou são utilizadas para fins terapêuticos por civilizações do mundo todo ao longo da história da humanidade. Produtos derivados de plantas tais como atropina, morfina, pilocarpina e quinina, que passaram a fazer parte da medicina convencional apenas há alguns anos já foram aproveitados por diversos povos no tratamento das mais variadas moléstias.

A importância do reino vegetal como fonte de produtos medicinais é bem documentada. De acordo com FARNSWORTH (1990, apud STAFFORD, 1992) atualmente cerca de 119 compostos químicos de estrutura conhecida e derivados de plantas são utilizados como medicamento, preferindo-se a extração diretamente das plantas ao invés da síntese química devido à complexidade estrutural de tais compostos. As plantas superiores ainda constituem a principal fonte de compostos terapêuticos e estima-se que 64% da população mundial as utiliza atualmente como medicamento. Levantamentos realizados nos EUA no início da década de 80 revelaram que 25% dos medicamentos receitados pelos médicos continham em suas formulações ao menos um princípio ativo retirado diretamente de plantas superiores ou um produto natural modificado sinteticamente (ROBERTS, 1988). Apesar da importância das plantas como fonte de medicamentos, até hoje somente cerca de 15% das espécies vegetais conhecidas no mundo foram investigadas com relação à presença de substâncias de caráter medicinal.

Como o mundo atual necessita cada vez mais de medicamentos com qualidade crescente a baixo custo, os processos biotecnológicos aplicados às plantas medicinais apresentam-se como grandes alternativas para os métodos tradicionais de

obtenção de produtos naturais. Os compostos derivados de plantas frequentemente alcançam valores elevados de comercialização no mercado, fato que justifica o desenvolvimento de processos biotecnológicos que possibilitem obter esses compostos a custos menores que pelos processos convencionais, tais como extração em plantas inteiras, síntese química ou produção por microorganismos (ROBERTS, 1988; ENDRESS, 1994).

A biotecnologia recebeu novos impulsos a partir de meados da década de 70 com o início da utilização de técnicas de engenharia genética (basicamente identificação, isolamento e transferência de informações genéticas específicas de um indivíduo para outro), tornando possível a manipulação de características relativas à produção de metabólitos secundários, embora obedecendo a certas limitações e restrições (LEE & AN, 1986).

O potencial de utilização da biotecnologia e da engenharia genética na produção de compostos secundários aumenta proporcionalmente ao aumento do valor do composto em questão. Estimativas mostram que a produção através de culturas de células vegetais é economicamente viável para compostos com valor de mercado entre US\$ 500 e US\$ 1000/kg. Vários produtos naturais de interesse medicinal, alimentício e cosmético têm valores de mercado significativamente maiores que os acima citados e justificam o uso da biotecnologia, entre os quais podemos citar:

1. **Digoxina**, extraída de *Digitalis lanata*, de aplicação medicinal e comercializada pela Boehringer Mannheim (Alemanha) ao preço de US\$ 3000/kg;
2. **Jasmin**, extraída do gênero *Jasminum* com finalidades aromáticas, comercializado ao preço de US\$ 5000-6000/kg no Japão;
3. **Peroxidase** de aplicação bioquímica, extraída de plantas do gênero *Raphanus* e comercializado pelas Indústrias Toyobo (Japão) no valor de US\$ 2000/kg;
4. **Shikonina**, utilizada nas indústrias farmacêutica, cosmética e química (corantes), extraída de *Lithospermum erythrorhizon* e comercializada pela Mitsui Lion Co. (Japão) por US\$ 4000/kg;
5. **Vinblastina e Vincristina**, alcalóides de utilização farmacêutica extraídos de

Catharanthus roseus e comercializados a US\$ 3000/kg pela Eli Lilly dos EUA (ENDRESS, 1994).

Também devemos observar que os compostos secundários derivados de plantas frequentemente apresentam uma estrutura altamente complexa, necessária para que ocorra atividade biológica, os quais não podem ser obtidos a preços mais acessíveis através de síntese por métodos organoquímicos, justificando mais uma vez a utilização de processos biotecnológicos e de engenharia genética. O potencial biotecnológico da cultura de tecidos e células de *Artemisia annua* L. para produção da lactona sesquiterpênica artemisinina e de seus precursores e derivados utilizados no combate à malária deve-se em primeiro lugar à estrutura estereoquímica da molécula de artemisinina, impossível de ser produzida em escala industrial com custos economicamente viáveis (ENDRESS, 1994). Como a *Artemisia annua* L. vem se mostrando bastante eficaz no tratamento de casos severos de malária e produz compostos importantes para o combate à doença, vários estudos já foram efetuados com bons resultados utilizando-se técnicas de biotecnologia entre as quais podemos citar o cultivo de plantas "in vitro" (NAIR *et al.*, 1986; WHIPKEY *et al.*, 1992; BROWN, 1993; 1994; PANIEGO & GIULIETTI, 1994) e culturas de suspensões celulares (NAIR *et al.*, 1986; TAWFIQ *et al.*, 1989; CHIUNG-SHEUE *et al.*, 1992).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo para obtenção de raízes transformadas de *Artemisia annua* L. utilizando-se a infecção por *Agrobacterium rhizogenes* para a transformação. A partir dessas raízes visamos o estabelecimento do cultivo e uma investigação química quanto a existência de compostos de caráter medicinal (anti-maláricos) nas raízes transformadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A malária

Conhecida desde tempos bastante remotos, já existiam descrições da malária em antigos manuscritos egípcios datados do século XVI A.C.. Associada à sintomas como febres e tremores, a doença veio novamente a ser descrita na Grécia clássica por discípulos de Hipócrates, os primeiros a perceber a associação entre a malária e a ocorrência de febres a intervalos regulares. Na mesma época, em torno do século V A.C. esses mesmos estudiosos observaram a ligação das febres com os pântanos. No século XVII os italianos acreditavam que a contaminação pela malária ocorria devido ao "ar ruim" (*mal aria*) que respirava-se próximo a locais pantanosos originando o termo *malaria* tal como o conhecemos e que foi incluso na literatura médica inglesa durante a primeira metade do século XIX. Até hoje a denominação da doença em francês (paludisme) e em espanhol (paludismo) derivam do latim *palus*, que significa pântano (KLAYMAN, 1989).

A malária é atualmente uma das mais severas moléstias infecciosas existentes nos trópicos. Manifesta-se normalmente em regiões quentes e úmidas com temperaturas acima de 20°C e umidade relativa do ar maior que 55%, e encontra-se em crescimento em várias áreas. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, ocorrem anualmente 300 a 500 milhões de casos clínicos de malária resultando em mais de 2,7 milhões de mortes (NUSSENZWEIG & LONG, 1994), sendo que desse total de mortes, pelo menos 1 milhão refere-se a crianças com menos de 5 anos de idade (KLAYMAN, 1989). Apenas como termo de comparação, a revista Lancet publicada em setembro de 1994 citou, em um artigo relativo a vacinas, alguns números sobre a AIDS estimando em cerca de 2

milhões os novos casos registrados a cada ano e aproximadamente 500 mil mortes anuais (CARVALHEIRO, 1995). Por esses números podemos perceber a seriedade do problema da malária, que mata atualmente 5 vezes mais que a AIDS. A grande maioria dos casos de malária ocorre na África, mas grandes áreas da Ásia, América Central e América do Sul contribuem significativamente para o aumento dessas estatísticas (NUSSENZWEIG & LONG, 1994), sendo que somente no Brasil foram 500 mil os casos notificados no ano de 1994 (BOULOS, 1995). A Organização Mundial da Saúde estima ainda que cerca de 40% da população mundial sofre riscos de ser contaminada pelo parasita e que aproximadamente 360 milhões de pessoas vivem em áreas onde a doença permanece endêmica apesar dos esforços realizados para a sua erradicação (WIRTH *et al.*, 1986).

Atualmente, conhece-se ao redor de uma centena de diferentes protozoários do gênero *Plasmodium* causadores da malária e somente quatro espécies (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum*) são capazes de causar a doença em humanos (KLAYMAN, 1989). Em muitas partes do mundo, o parasita predominante é o *P. falciparum*, que causa a forma aguda mais severa (a malária cerebral), freqüentemente fatal em crianças e que mata uma em cada dez pessoas infectadas. O *P. vivax* causa a segunda forma grave da doença, que se caracteriza por recaídas causadas pelos parasitas latentes que permanecem no fígado (WIRTH *et al.*, 1986). A malária é transmitida por algumas espécies de mosquito do gênero *Anopheles* que carregam em sua glândula salivar o parasita da malária no estágio infeccioso. Somente a fêmea desse mosquito se alimenta de sangue e tem a picada capaz de penetrar a pele (KLAYMAN, 1989). Os mosquitos do gênero *Anopheles* são preferencialmente rurais, habitando florestas e matas e suas proximidades, principalmente perto de lagoas e águas limpas mas também vivem dentro e ao redor das residências próximas a áreas de grande vegetação. Têm hábitos crepusculares e noturnos não sendo comum se alimentarem durante o dia, proliferam-se em águas limpas e no Brasil distribuem-se por todo o país, com exceção das

áreas de seca no Nordeste e do extremo sul. No Estado de São Paulo são encontrados em algumas regiões da bacia dos rios Paraná e Paranapanema e na região da Mata Atlântica (litoral sul e norte de São Paulo) onde são registrados mais de 90% dos 40 casos anuais de transmissão da malária dentro do próprio Estado, segundo estimativas da Superintendência de Controle de Endemias (Sucec) da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (PEREIRA, 1995, apud ADEODATO & MASCARENHAS, 1995).

A forma infecciosa do parasita que é introduzida no hospedeiro pela picada do mosquito corresponde aos esporozoítos, que após circular brevemente pela corrente sanguínea chegam até as células do fígado, onde se instalam sem provocar sintomas e se transformam em formas chamadas exoeritrocíticas. Cada uma produz milhares de parasitas (merozoítos) que, após alguns dias caem na corrente sanguínea e invadem as hemácias, convertendo-se em trofozoítos. Estes crescem e convertem-se em esquizontes que, rompendo suas células hospedeiras dão origem e liberam novos merozoítos que vão parasitar outras hemácias. Alguns merozoítos se transformam em gametócitos (masculinos e femininos), formas que poderão ser apanhadas por um mosquito ao picar o indivíduo infectado, iniciando um novo ciclo. Os sintomas tais como calafrios e febre, aparecem no hospedeiro quando as hemácias são destruídas e os merozoítos libertados (Figura 1). Como o ciclo dos parasitas é coordenado, os ataques se repetem em intervalos regulares: no caso de *P. falciparum*, as febres ocorrem a cada dois dias (NUSSENZWEIG & NUSSENZWEIG, 1985).

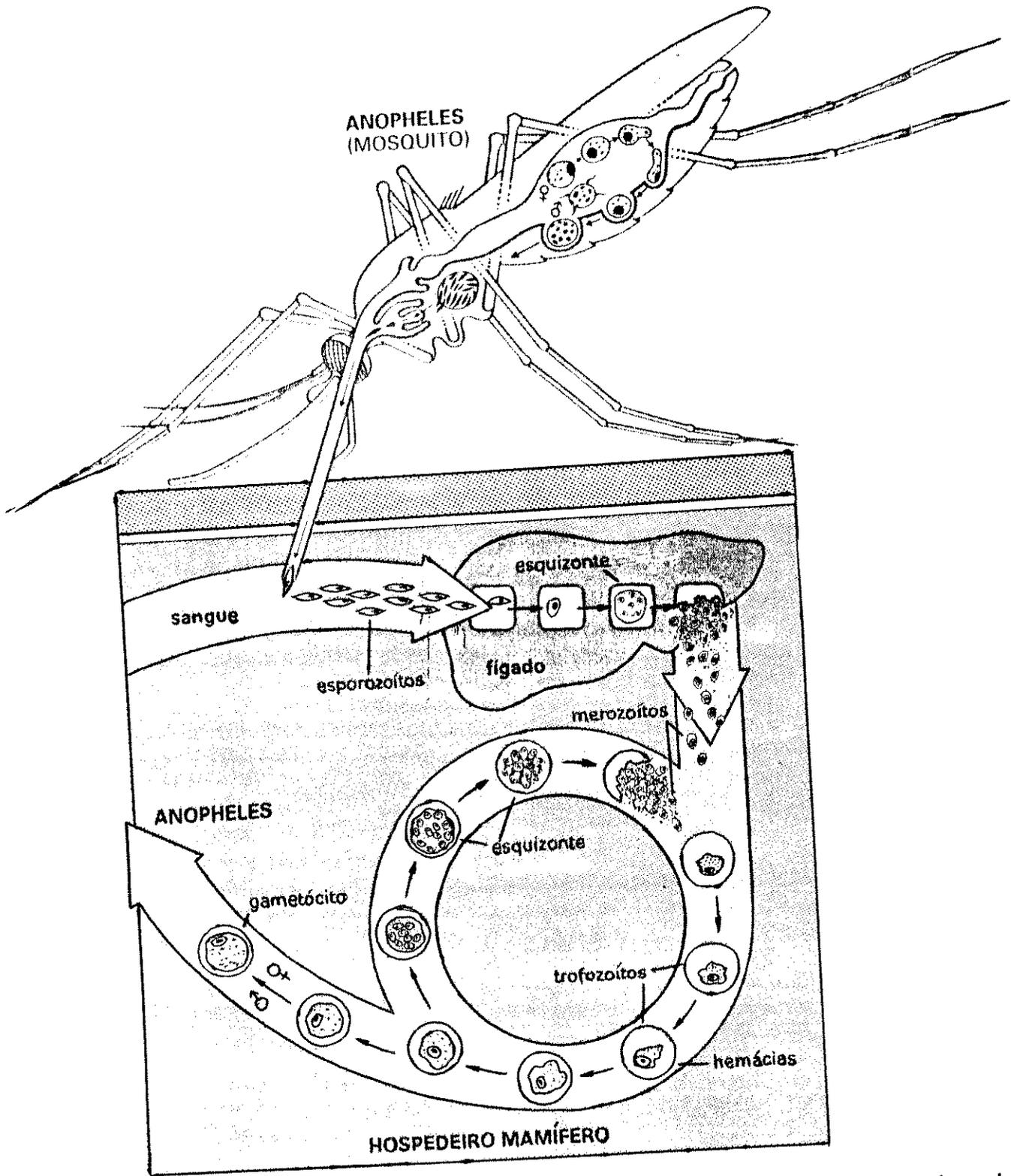


FIGURA 1 - Ciclo de vida do *Plasmodium*, parasita causador da malária (extraído de NUSSENZWEIG & NUSSENZWEIG, 1985).

Ao contrário de muitas moléstias que produzem resistência a reinfecções ao longo da vida a malária somente causa imunidade após muitas infecções recorrentes ao longo dos anos. Além disso, a imunidade adquirida desse modo é apenas parcialmente efetiva e resulta em infecções brandas e às vezes assintomáticas, apesar da presença dos parasitas. Esse tipo de imunidade também não dura por muito tempo, ao menos que seja reforçada por reinfecções freqüentes (NUSSENZWEIG & LONG, 1994). No entanto, observa-se que em áreas endêmicas as pessoas que sobreviveram a uma infecção pelo *P. falciparum* durante a infância desenvolvem um certo grau de imunidade à doença (KLAYMAN, 1989). Sabe-se também que pessoas que vivem em áreas endêmicas podem ter características genéticas que lhes conferem uma certa resistência à ação do parasita. DIAMOND (1989, apud KLAYMAN, 1989) observou que indivíduos africanos que possuem o gene causador da anemia falciforme sofrem menos fortemente os efeitos da malária causada pelo *P. falciparum* em relação aos indivíduos que não possuem essa característica genética e segundo MILLER (1992) a malária é uma das poucas doenças para as quais podemos estimar taxas de mortalidade (passadas e/ou futuras) com base nas frequências atuais de determinados genes. Tais estimativas baseiam-se na hipótese de que uma mutação na cadeia β da hemoglobina A que gera a hemoglobina S (característica comum em indivíduos de determinadas regiões da África) e, da mesma maneira glóbulos vermelhos que apresentam mutações em proteínas da membrana celular (ocorrendo em indivíduos do sudeste asiático) foram características selecionadas devido ao fato de que tais mutações, quando heterozigotas, conferem resistência à malária severa. De acordo com tal hipótese a mortalidade por malária pode ser prevista a partir da frequência desses genes mutantes dentro das populações.

A solução adotada durante anos para o combate dos mosquitos transmissores foi a aplicação de inseticidas organoclorados como o DDT, sendo este altamente tóxico e biocumulativo. Mais tarde houve a substituição do DDT pelos

organofosforados (de menor toxicidade) e pelos piretróides. Atualmente há a tendência de substituição do controle químico pelo biológico, utilizando-se uma toxina produzida pela bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* durante o seu metabolismo. É utilizada diluída em água e vem demonstrando ação, embora não muito intensa, sobre as larvas do *Anopheles* (LEMOS, 1995, apud ADEODATO & MASCARENHAS, 1995).

As tentativas de controle e tratamento da malária não são recentes. Em 1834 os químicos franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou isolaram um alcalóide da árvore cinchona, a quinina, que se tornou o principal tratamento disponível durante muitos anos (KLAYMAN, 1985; 1989). Até hoje os indivíduos infectados vêm sendo tratados com drogas derivadas de quinina, principalmente a cloroquina, a mais usada e o padrão em relação ao qual as demais drogas são avaliadas, embora a espécie mais letal do mosquito (o *P. falciparum*) tenha se tornado geneticamente resistente à cloroquina. Existem ainda outros problemas: a quinina, quando ministrada em altas doses, causa efeitos colaterais como ranger de dentes, visão embaçada e pode causar parto prematuro em mulheres em avançado estado de gestação. Existem atualmente outras drogas capazes de tratar a doença, como atebrina, mefloquina, amodiaquina, proguanil e pirimetamina, cada uma delas atuando em um determinado estágio do ciclo de vida do parasita. Algumas têm propriedades terapêuticas superiores à quinina, mas os agentes patogênicos apresentam forte tendência a sofrer mutações tornando-se resistentes ao tratamento por todas as drogas (KLAYMAN, 1989).

A disseminação da malária também parece ser estimulada por alterações de caráter ambiental: com a queima das matas e a devastação das florestas as temperaturas locais tendem a subir, fazendo com que os mosquitos infectados migrem para regiões onde a população nativa não apresenta imunidade adquirida e passem assim a apresentar a doença. Os maiores danos provocados pela malária aparecem em regiões próximas a áreas endêmicas. Nessas áreas limítrofes a doença manifesta-se sazonalmente e as

populações não apresentam a mesma imunidade das populações que habitam as regiões endêmicas onde a doença ocorre durante todo o ano (MARSHALL, 1990).

Na tentativa de controlar e erradicar a malária vários esforços devem ser unidos, pois em muitos países tropicais esta doença é um sério problema de saúde pública. Os efeitos da malária são bastante graves para a população dos trópicos, indo de simples períodos de tratamento até total incapacitação dos indivíduos para o trabalho. Por isso a malária vem sendo culpada de impedir o crescimento de nações inteiras sendo fator problemático quando diz respeito a países tropicais em desenvolvimento, o que inclui o Brasil. Existem vários grupos trabalhando no desenvolvimento de vacinas visando a imunidade à doença através de inoculação de formas atenuadas do parasita ou através de compostos sintetizados quimicamente, mas a complexidade do parasita e o seu elevado grau de adaptação ao hospedeiro não permitiram ainda que se obtivesse uma vacina totalmente eficaz (NUSSENZWEIG & NUSSENZWEIG, 1985; CHERFAS, 1990; MILLER, 1992; VALERO *et al.*, 1993; NUSSENZWEIG & LONG, 1994). De acordo com BOULOS (1995), os melhores resultados obtidos até agora foram do pesquisador colombiano Manuel Patarroyo, com uma vacina que apresenta cerca de 30% de eficácia na proteção contra a infecção, o que significa, referindo-se a uma doença que provoca 300 a 500 milhões de casos clínicos anuais, 100 a 150 milhões de indivíduos que deixariam de contrair a doença a cada ano. As pesquisas visando o aprimoramento das vacinas continuam, porém até que se consiga obtê-las a preços acessíveis e promover vacinações em massa, a alternativa passa a ser a utilização de derivados semi-sintéticos da molécula de artemisinina, produto natural da planta *Artemisia annua* L. que vem se mostrando bastante eficaz no tratamento dos indivíduos infectados pelo parasita.

3.2. A planta *Artemisia annua* L.

3.2.1. Aspectos históricos

Na Grécia antiga o gênero *Artemisia* foi assim denominado com referência a Artemis, deusa da maternidade, pois plantas desse gênero eram utilizadas como contraceptivos e para regular desordens da menstruação. Também alegava-se que essas plantas neutralizavam vários tipos de venenos, de cogumelos a dragões marinhos. Apesar de várias espécies de *Artemisia* terem sido utilizadas pelo herbalista grego Dioscórides para eliminação de parasitas intestinais o nome popular *wormwood* deriva na verdade do Anglo-saxônico *wermode*, que significa "protetor mental". Especificamente para *Artemisia annua* L., a designação da espécie refere-se ao ciclo anual da planta (FERREIRA, 1994; KEVILLE, 1994).

A *Artemisia annua* L. faz parte da mais tradicional medicina chinesa, sendo conhecida como *qing hao* (que significa erva verde e pronuncia-se "ching-hao") e vem sendo utilizada há séculos para tratamento de vários tipos de moléstias, incluindo febres de diferentes origens. O relato mais antigo de que se tem notícia está em *Receitas para 52 tipos de moléstias*, pertencente à dinastia Mawangdui Han e datado de 168 a.C., onde recomendava-se o uso da planta para tratamento de hemorróidas. A espécie é novamente citada em *Zhou Hou Bei Ji Fang* (Livro de Prescrições para Tratamentos de Emergência) escrito em 340 d.C., onde o autor, Ge Hong, recomendava, para reduzir febres, embeber um punhado de *qing hao* em 1 "sheng" (cerca de 1 litro) de água, coar e beber. Em 1596, Li Shizen, um famoso herbalista e farmacologista chinês, cita em seu *Ben Cao Gang Mu* (Compêndio de Matéria Médica) que a febre e os tremores da malária poderiam ser combatidos com preparados de *qing hao*. Uma decocção de *Artemisia annua* também foi sugerida como tratamento para malária no tratado *Wenbing Tiaobian* em 1798 (KLAYMAN, 1985;

1989). Existem, no entanto, algumas divergências com relação à nomenclatura que relaciona *qing hao* a *Artemisia annua* L.: alguns pesquisadores relacionam *qing hao* com *Artemisia apiaceae* ou *Artemisia dracunculus*, e *huang hua hao* (que significa erva de flores amarelas) com *Artemisia annua*. Apesar dessas divergências atualmente a grande maioria das citações relativas ao *qing hao* referem-se à *Artemisia annua* L..

Existem poucos relatos na literatura e pouco se conhece a respeito do cultivo da *Artemisia annua* L., sendo ainda encontrada em quantidade nos locais onde é nativa e utilizada a partir de coletas. Planta exótica, foi introduzida no Brasil em 1987 através de sementes provenientes dos Estados Unidos, pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônomicas (CPQBA/UNICAMP) que desde então vem realizando experimentos e observando o comportamento da espécie com o objetivo de otimizar o cultivo em nossas condições (FIGUEIRA, 1995).

3.2.2. Características botânicas

Artemisia annua L. (também conhecida como sweet wormwood, annual wormwood, sweet annie ou, para nós, simplesmente artemisia) é uma dicotiledônea anual, pertencente à família *Asteraceae*, tribo *Anthemidae*. Originária da Ásia, mais provavelmente da China, tem sua ocorrência natural em regiões de clima temperado, sendo cultivada na Europa pelas suas qualidades aromáticas e na China como planta medicinal (KLAYMAN, 1989; LÊ & COLLET, 1991; WHIPKEY *et al.*, 1992; WOERDENBAG *et al.*, 1993a; 1994).

A planta apresenta caráter arbustivo podendo atingir 2 metros de altura. Fácil de ser cultivada, propaga-se por sementes e prefere solos relativamente secos e pobres. As sementes são fotoblásticas positivas e mantêm o vigor e a viabilidade por longo período (de meses a anos) quando

armazenadas em locais secos e a baixa temperatura (SHEPHERD *et al.*, 1992). É planta de dias curtos, tem fotoperíodo crítico de 13 horas e floresce duas semanas após a indução (FERREIRA, 1994). As características de fotoperíodo da planta fazem com que, ironicamente, as regiões tropicais que apresentam a malária como moléstia endêmica não mostrem-se favoráveis ao cultivo da artemisia.

Conforme descrição de ARANHA & YAHN (1988, apud FIGUEIRA, 1995) as plantas de *Artemisia annua* L. apresentam hastes cilíndricas, longitudinalmente estriadas e de coloração verde-pálida. As folhas são simples, pilosas, com nervuras principais proeminentes, profundamente partidas, sendo as inferiores rosuladas e as superiores alternadas, diminuindo de tamanho conforme se aproximam do ápice da planta. As inflorescências distribuem-se ao longo de toda a haste, em panículas de capítulos pequenos e multifloros, com receptáculo floral convexo e média de 50-60 flores pediceladas. O involúcro apresenta brácteas em duas séries, todas as brácteas com coloração verde e as anteriores com tamanho maior. As flores marginais são femininas, dispostas em uma só série e com coloração verde-amarelada, enquanto as flores centrais são hermafroditas e com coloração amarela. Os frutos são do tipo aquênio e apresentam tonalidade acastanhada.



FIGURA 2 - A planta *Artemisia annua* L.

3.2.3. Características quimiotaxonômicas

A *Artemisia annua* L. pertence à família Asteraceae, quimicamente muito distinta. A presença de inulina, ácidos graxos, lactonas sesquiterpênicas, álcoois triterpênicos, ácido caféico, flavonas e flavonóis metilados, em combinação com uma total ausência de taninos e de iridóides glicosilados são referências importantes para a família. Também a presença de compostos acetilênicos e de óleos essenciais é considerada característica para as Asteraceae (HEGNAUER, 1964, apud LIMA, 1995).

A ocorrência combinada de lactonas sesquiterpênicas, compostos acetilênicos e inulina é quase tão característica das Asteraceae quanto as suas inflorescências do tipo capítulo. A *Artemisia annua* L. pertence à tribo Anthemidae, produtora marcante de lactonas sesquiterpênicas dentro da família Asteraceae. As lactonas sesquiterpênicas são substâncias incolores, com sabor amargo, lipofílicas e representam o grupo de substâncias mais característico das Asteraceae. Estão presentes principalmente nos tecidos foliares e podem constituir até 5% do peso seco da planta. Muitas são tóxicas para o gado e seu principal papel ecológico, na família, parece ser o de dissuasivo alimentar para mamíferos. Podem também ser inseticidas, mas isso é menos importante que seu poder dissuasivo sobre coelhos e outros animais herbívoros. Além disso podem causar dermatites de contato em mamíferos. Além dessas atividades biológicas as lactonas sesquiterpênicas apresentam propriedades antitumorais, fitotóxicas e podem agir como reguladores de crescimento. São depositados na planta nos vasos laticíferos ou em cavidades subcuticulares ou pelos glandulares, sendo em geral interpretadas como componentes dos óleos essenciais que tornaram-se não voláteis devido a processos de oxidação (LIMA, 1995).

No caso específico da *Artemisia annua* L., a artemisinina é a lactona sesquiterpênica de maior importância devido à eficiente ação anti-malárica que apresenta. Segundo

RODRIGUEZ *et al.* (1976), as lactonas sesquiterpênicas são encontradas em todos os subgêneros de *Artemisia*, podendo ocorrer em vários órgãos da planta mas são comumente encontradas em folhas e partes florais associadas a tricomas glandulares. Portanto, essas substâncias estão quase que restritas às partes aéreas da planta. Já os compostos acetilênicos podem ser encontrados tanto nesses órgãos como em órgãos subterrâneos. Em algumas espécies onde essas substâncias ocorrem conjuntamente, elas se mostram em órgãos separados. Em *Artemisia absinthium*, por exemplo, as lactonas sesquiterpênicas ocorrem nas partes aéreas e os compostos acetilênicos nas raízes. Existem casos, no entanto, da ocorrência de compostos acetilênicos tanto nas partes aéreas quanto nas subterrâneas (por exemplo, em *Artemisia capillaris*). Em algumas espécies, como em *Artemisia abrotanum*, os compostos acetilênicos ocorrem na raiz e nas partes aéreas aparecem cumarinas.

3.2.4. Produção de compostos anti-maláricos

No final da década de 60, um grupo de cientistas chineses iniciou pesquisas visando comprovar cientificamente a atividade anti-malárica da *Artemisia annua* L. e isolar o composto químico responsável pela ação medicinal da planta. As primeiras tentativas, com extração em água quente, não apresentaram resultados significativos. Posteriormente, novas tentativas utilizando extração à baixa temperatura com solventes orgânicos apresentaram resultados positivos no tratamento de ratos e macacos infectados. O composto ativo principal, um sesquiterpeno lactônico peróxido, foi isolado em 1972 e denominado *qing hao su* (em chinês: *su* = extrato de; *qing hao* = erva verde) ou, para nós do Ocidente, **artemisinina** (KLAYMAN, 1985; 1989; FERREIRA, 1994; WOERDENBAG *et al.*, 1994).

A artemisinina mostrou ação efetiva contra diferentes cepas de *P. falciparum*, tanto resistentes quanto

suscetíveis à cloroquina, bem como bons resultados no tratamento de malária cerebral maligna (KLAYMAN, 1989; WHIPKEY *et al.*, 1992; JAZIRI *et al.*, 1993; PANIEGO & GIULIETTI, 1994). Ao longo da década de 80 foram conduzidos vários estudos clínicos em locais como China, Vietnã, Tailândia e Gâmbia, comprovando uma rápida eficiência do composto e derivados no tratamento de casos severos de malária (ANÔNIMO, 1992; WHITE *et al.*, 1992).

Quimicamente a artemisinina é classificada como um sesquiterpeno lactônico peróxido, sendo que os mono e sesquiterpenos são os compostos responsáveis pelo odor de muitas plantas aromáticas. A quinina e todas as outras drogas anti-maláricas são alcalóides e possuem átomos de nitrogênio, o que não ocorre no caso da artemisinina. Sabe-se que a porção quimicamente ativa da molécula é o grupo peróxido, de ocorrência rara em metabólitos secundários e que a existência e a integridade do grupo são indispensáveis para a atividade anti-malárica. Compostos derivados que não possuem o grupo peróxido ou o apresentam incompleto são desprovidos de atividade. A atividade terapêutica consiste na destruição da membrana celular do *Plasmodium*, pois a artemisinina provoca mudanças estruturais nas membranas levando à perda do citoplasma e conseqüente morte do parasita (KLAYMAN, 1989).

A síntese orgânica total da artemisinina já foi estabelecida (SCHMID & HOFHEINZ, 1983; XU *et al.*, 1986; AVERY *et al.*, 1987; RAVINDRANATH *et al.*, 1990; AVERY *et al.*, 1992), porém o composto é bastante complexo o que torna o processo difícil. Além disso, os níveis obtidos por síntese são extremamente baixos tornando a síntese química economicamente desinteressante e fazendo com que a planta *Artemisia annua* L. continue sendo a única fonte válida de artemisinina nos dias de hoje.

A artemisinina é um composto incolor e inodoro, com toxicidade relativamente baixa. DUTTA *et al.* (1989), em experimentos com cobaias, detectou níveis de LD₅₀ de 5,1 g/kg para administração oral e de 2,8 g/kg para administração intramuscular. Apesar da baixa toxicidade existem relatos de

experimentos onde se verifica uma ação citotóxica da artemisinina contra linhagens celulares tumorosas, e ainda nesse caso o grupo peróxido aparece como sendo responsável pela atividade. Artenuína B e ácido artemisinínico não apresentaram as mesmas características citotóxicas (ZHENG, 1994).

A artemisinina também apresenta como característica uma baixa solubilidade, tanto em óleo quanto em água, o que dificulta bastante a sua administração. Vêm sendo desenvolvidos derivados semi-sintéticos da artemisinina, com melhores características de solubilidade, como por exemplo arteéter e arteméter (ambos solúveis em óleo), e artesunato de sódio e artelinato de sódio (ambos solúveis em água). Alguns desses compostos, além de apresentarem características melhores quanto à solubilidade demonstraram ser mais potentes contra a malária que a artemisinina, sendo porém mais tóxicos (TITULAER *et al.*, 1991; WOERDENBAG *et al.*, 1993b). FERREIRA (1994) cita que o arteméter em solução oleosa aplicável diretamente via injeção intramuscular, vem sendo testado comercialmente na República Popular da China e recentemente foi iniciada a sua comercialização pela indústria farmacêutica francesa Rhône Poulenc na África sob o nome de *Paluther*, enquanto outros países afetados pela malária vêm aguardando a liberação dessa forma injetável do arteméter para comercialização.

A obtenção de outros compostos anti-maláricos de maior solubilidade e estabilidade vem sendo desenvolvida tomando-se como ponto de partida a artemisinina, mas este não é o sesquiterpeno encontrado em maiores quantidades em *Artemisia annua* L. e sim outros compostos tais como o ácido artemisinínico e a artenuína B. No caso do ácido artemisinínico, por exemplo, este é encontrado na planta em quantidades 8 a 10 vezes maiores que a artemisinina (ROTH & ACTON, 1987; JUNG *et al.*, 1990; MISRA *et al.* 1993). Também a artenuína B encontra-se em maior quantidade, o que vêm estimulando o desenvolvimento de transformações químicas para estes precursores, chegando-se assim à obtenção indireta de artemisinina.

Ainda existem divergências com relação a determinados pontos da rota biossintética da artemisinina e de seus precursores. AKHILA *et al.* (1987; 1990) trabalhando com isótopos radioativos (^3H e ^{14}C) descreveram a biossíntese da artemisinina derivando do ácido mevalônico pela rota do isopreno e a biossíntese do ácido artemisinínico. Outros grupos de pesquisadores estudando a biossíntese desses compostos propuseram que o ácido artemisinínico seria precursor tanto da artemisinina quanto da artenuína B, havendo diferenças relativas à ocorrência de processos seqüenciais ou independentes (EL-FERALY *et al.*, 1986; ROTH & ACTON, 1987; 1989; JUNG *et al.*, 1990; SANGWAN *et al.*, 1993) (Figura 3).

Para plantas crescidas em condições de campo ou em casa de vegetação existem relatos de acúmulo de artemisinina em folhas, gemas, ramos secundários, flores e sementes (SINGH *et al.*, 1988; DELABAYS *et al.*, 1992; 1993; FERREIRA, 1994), enquanto que o caule principal contém quantidades muito pequenas e as raízes não acumulam o composto (PRAS *et al.*, 1991). No caso de cultivo "in vitro" foram encontradas baixas concentrações de artemisinina em culturas diferenciadas e em culturas não diferenciadas (calos e/ou culturas de células) o composto não foi encontrado ou foi encontrado apenas em traços (NAIR *et al.*, 1986; BROWN, 1993; 1994; FERREIRA, 1994; PANIEGO & GIULIETTI, 1994), sugerindo que um certo grau de diferenciação é necessário para a produção de artemisinina (BROWN, 1993; 1994). Já segundo TAWFIQ *et al.* (1989) e CHIUNG-SHEUE *et al.* (1992) foi observada atividade antiplasmodial para calos e culturas de células de *Artemisia annua* L. mesmo em casos onde artemisinina não foi detectada. NAIR *et al.* (1986) citam a liberação de artemisinina no meio líquido para culturas de células em suspensão. Quanto aos precursores: ácido artemisinínico e artenuína B também são encontrados em máxima concentração nas folhas, gemas e ramos secundários (WOERDENBAG *et al.*, 1991).

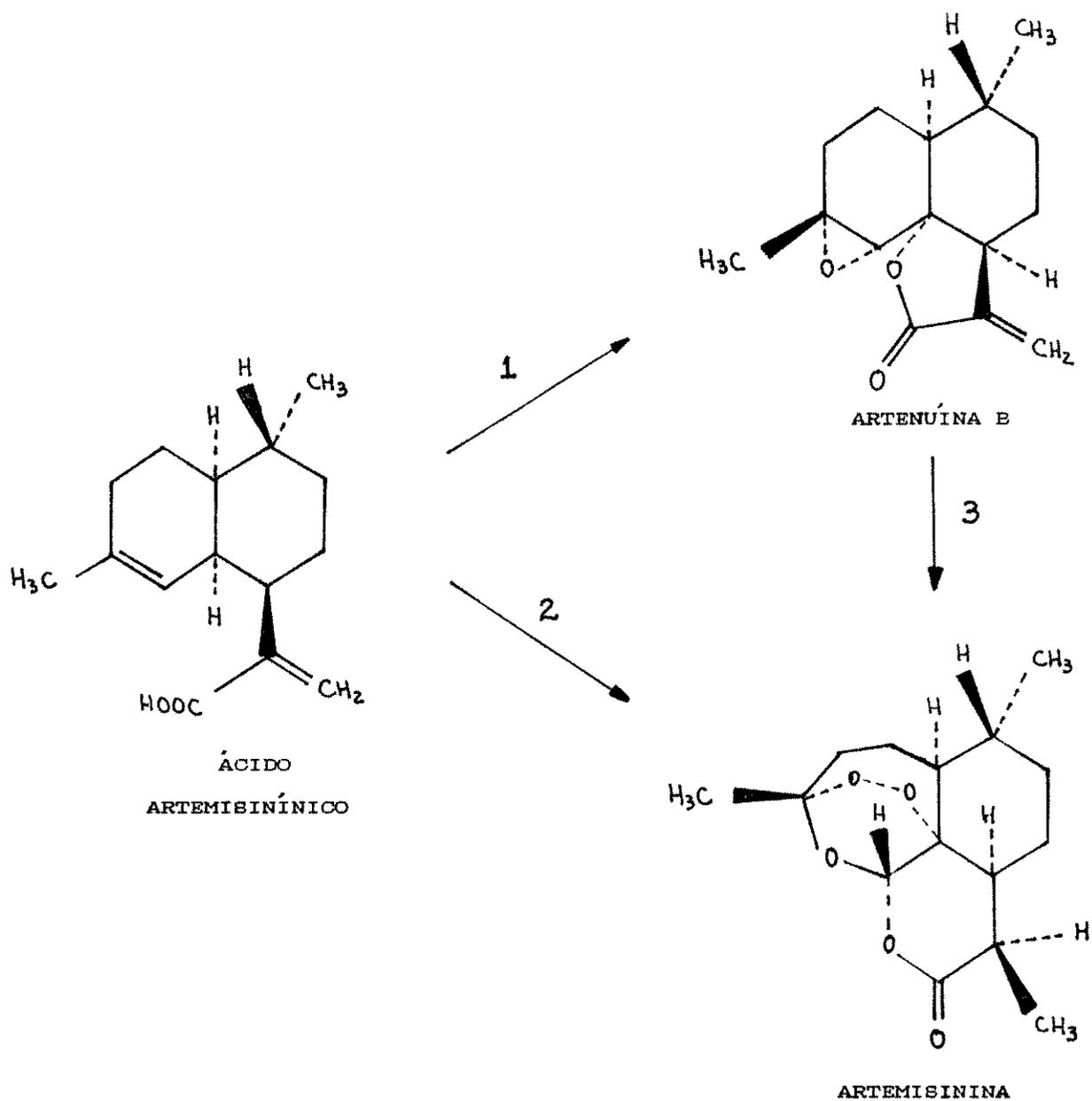


FIGURA 3 - Rotas biossintéticas propostas para artemisinina, artenuína B e ácido artemisinínico: 1. EL-FERALY *et al.* (1986); ROTH & ACTON (1989); JUNG *et al.* (1990); SANGWAN *et al.* (1993); 2. EL-FERALY *et al.* (1986); JUNG *et al.* (1990); 3. SANGWAN *et al.* (1993).

3.3. O processo de transformação via *Agrobacterium*

3.3.1. As bactérias do gênero *Agrobacterium*

A família *Rhizobiaceae* de bactérias de solo pode ser dividida da seguinte forma: 1. bactérias fixadoras de nitrogênio (gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Phyllobacterium*, entre outros) que apresentam tal característica quando crescendo livremente no solo em condições favoráveis ou em nódulos de raízes em plantas leguminosas, e 2. bactérias do gênero *Agrobacterium*, que são características por sua capacidade de induzir hipertrofias em plantas, especialmente dicotiledôneas. O gênero *Agrobacterium* compreende quatro espécies, sendo elas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium radiobacter* e *Agrobacterium rubi*. O *Agrobacterium tumefaciens* causa na planta infectada uma galha ou tumor ao nível da coroa (junção entre o caule e a raiz), sendo essa doença conhecida na Europa desde a Antiguidade e denominada galha da coroa ("crown gall") pelo seu aspecto. O *Agrobacterium rhizogenes* causa a síndrome de raízes em cabeleira ("hairy-root disease"), que caracteriza-se pelo crescimento lento e anormal de grande quantidade de raízes. O *Agrobacterium rubi* infecta espécies vegetais específicas e induz tumores nas partes aéreas da planta e *Agrobacterium radiobacter* é avirulenta, embora seja frequentemente encontrada em estreita associação com as espécies virulentas (GORDON, 1981).

Há quase 90 anos atrás, em 1907, os pesquisadores Smith e Townsend (apud HOOYKAAS & SCHILPERDORT, 1992) publicaram um artigo no qual apresentavam evidências de que a bactéria hoje conhecida como *Agrobacterium tumefaciens* seria o agente causal da galha da coroa. Também há bastante tempo se tem conhecimento da produção de raízes adventícias devido à infecção pela bactéria que hoje sabemos ser a *Agrobacterium rhizogenes*, tendo sido demonstrado em 1930 por Riker e seus colaboradores

(apud BIROT *et al.*, 1987). No entanto, o processo de indução da galha da coroa despertou inicialmente um maior interesse e foi pesquisado com mais intensidade estimulado pela esperança de uma melhor compreensão da oncogênese em geral. Após um período de diminuição, as pesquisas recomeçaram ao perceber-se que a base molecular da indução da galha da coroa poderia ser uma transferência de oncogenes da bactéria para a planta e que esse sistema poderia vir a ser explorado em trabalhos da área de engenharia genética vegetal.

A chave do processo de indução foi encontrada cerca de 20 anos atrás (ZAENEN *et al.*, 1974; VAN LAREBEKE *et al.*, 1975) com a descoberta de elementos extracromossômicos (plasmídeos) extremamente grandes (mais de 200 kb) em cepas virulentas de *Agrobacterium tumefaciens*, abrigando genes diretamente envolvidos na indução da doença. A descoberta da base genética levou os pesquisadores a outro ponto básico do processo, o fato de que a manifestação dos sintomas estaria relacionada à transferência dos genes da bactéria para a planta com uma conseqüente transformação no genoma da planta hospedeira. A partir de então o *Agrobacterium* passou a ser associado à possibilidade de utilização como vetor para transferência de genes entre plantas, dando início ao grande volume de pesquisas executadas na área durante os últimos anos.

3.3.2. Propriedades gerais dos plasmídeos Ti e Ri

A maioria das espécies de bactérias contém um ou mais plasmídeos (moléculas de DNA circular separadas do DNA cromossômico da zona nuclear e que vivem livres no citoplasma da célula), sendo estes os fatores responsáveis pela indução das neoplasias no caso dos *Agrobacterium*. VAN LAREBEKE *et al.* (1975), após a descoberta do papel fundamental do plasmídeo do *Agrobacterium tumefaciens* na indução da galha da coroa, denominaram-no como plasmídeo Ti ("tumour-inducing"). Alguns anos

mais tarde foi demonstrado por MOORE *et al.* (1979) que a indução das raízes em cabeleira pelo *Agrobacterium rhizogenes* devia-se também à ação de um grande plasmídeo, o qual foi denominado "pHr". Esse plasmídeo foi, no entanto, renomeado em 1981 por Tepfer e Tempé como plasmídeo Ri ("root-inducing") passando a acompanhar a nomenclatura do *Agrobacterium tumefaciens* (BIROT *et al.*, 1987).

A execução de mapas funcionais dos plasmídeos Ti e Ri permitiram a identificação de regiões determinadas para cada função relacionada ao processo de infecção e manutenção da doença na planta hospedeira (Figura 4). A habilidade de transformar células vegetais está correlacionada com a presença nos *Agrobacterium* de duas importantes regiões nos plasmídeos Ti e Ri: estas são o próprio T-DNA e a região de virulência (*vir*). A região-T do plasmídeo é transferida da bactéria para a planta durante a infecção, passando a ser denominada T-DNA ("transferred-DNA") após ser integrada no genoma vegetal. Nessa etapa os genes presentes nessa região começam a se expressar dando início à manifestação dos sintomas da doença. Existem duas diferenças básicas entre células de tecidos normais e de tecidos transformados: 1. as células da galha da coroa e das raízes em cabeleira são tumorosas porque proliferam-se de modo autônomo na ausência dos fitohormônios (auxinas e citocininas) necessários para o crescimento de células vegetais normais; 2. as células tumorosas têm capacidade de produzir e excretar *opinas* (aminoácidos e derivados de açúcares não sintetizados pelas células normais e utilizados pela bactéria para sua manutenção). Os genes responsáveis por ambas as características localizam-se na região-T do plasmídeo, sendo que a combinação na biossíntese de fitohormônios regulada pelo T-DNA leva à morfologia tumoral dos tecidos transformados. Os genes que controlam a biossíntese dos fitohormônios são de origem bacteriana, pois a rota biossintética de auxinas utilizada pelo *Agrobacterium* não é normalmente utilizada pelas plantas (KLEE *et al.*, 1987). A região *vir* ou região de virulência é indispensável à transferência e

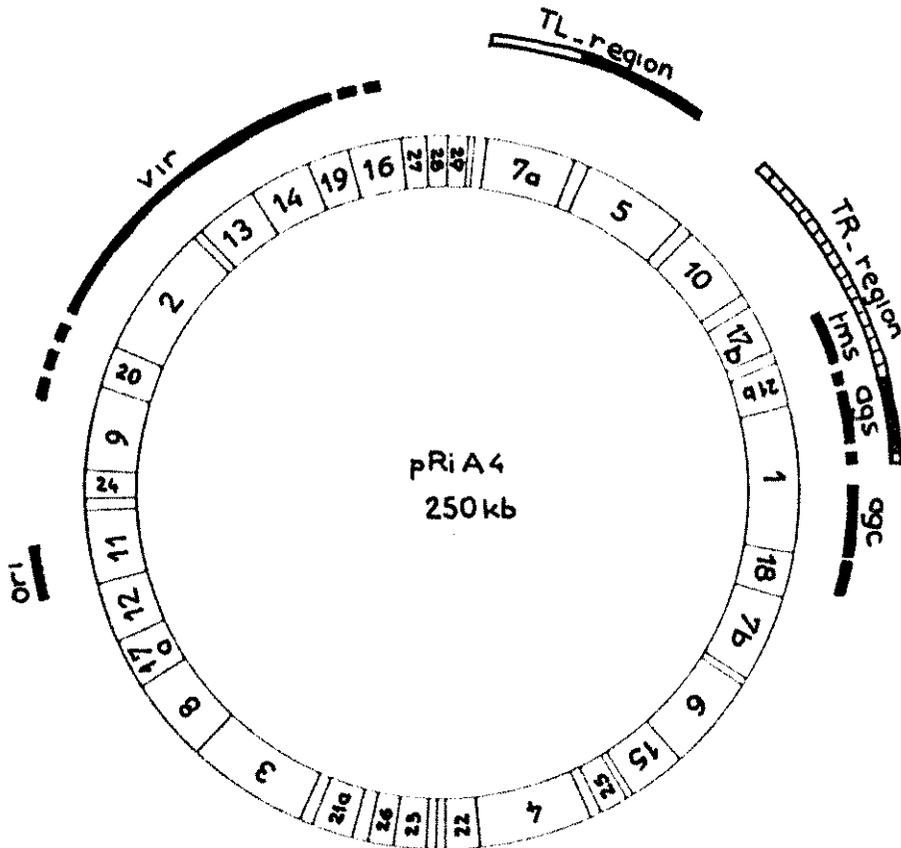


FIGURA 4 - Mapa funcional do plasmídeo Ri de *Agrobacterium rhizogenes* cepa A4. São mostradas as regiões TL- e TR- e a região *ori* (origem da replicação), bem como as regiões homólogas às funções conhecidas para os plasmídeos Ti: Região de virulência (*vir*), biossíntese de auxinas (*tms*), biossíntese de agropina (*ags*), catabolismo de agropina (*agc*). (Extraído de BIROT *et al.*, 1987).

integração da região-T no genoma nuclear das células da planta hospedeira. Localiza-se fora da região-T do plasmídeo, não sendo portanto transferida (JOUANIN, 1984), e age a partir de estímulos enviados pela célula vegetal após o ferimento (exsudatos) que ativam os genes dessa região (KLEE *et al.*, 1987). A região de catabolismo das opinas codifica para enzimas da bactéria as instruções para a degradação das opinas, porém não tem influência sobre a capacidade da bactéria de induzir tumores e localiza-se fora da região-T do plasmídeo (HUNTER & NEILL, 1990).

As diferentes cepas de *Agrobacterium* e seus plasmídeos são classificados de acordo com a principal opina encontrada nos tecidos transformados (BIROT *et al.*, 1987; HOODYKAAS & SCHILPEROORT, 1992), visto que a bactéria não contém nem sintetiza as opinas. Cada cepa específica de *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* induz à produção e ao armazenamento na planta infectada da opina necessária para a manutenção do metabolismo da bactéria correspondente. As opinas são produzidas tendo como precursores compostos comumente encontrados nas células vegetais, tais como alfa-ceto-ácidos, aminoácidos e açúcares simples, e a cepa de *Agrobacterium* responsável pela transformação da planta pode utilizá-las, seletivamente, como fonte de energia, carbono e/ou nitrogênio, de acordo com as suas necessidades. As opinas não apresentam função nas células vegetais e são utilizadas somente pela bactéria colonizadora que induziu a produção na planta, conferindo uma vantagem evolucionária ao *Agrobacterium* e aos Ti e Ri plasmídeos em relação a outras bactérias de solo (SAITO *et al.*, 1992).

3.3.3. O processo de infecção e a manifestação dos sintomas

Desde meados do nosso século sabe-se que para que o *Agrobacterium* penetre no tecido vegetal há a necessidade de que a planta apresente um ferimento que permita a entrada da

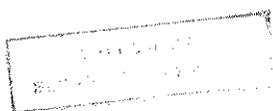
bactéria (BRAUN, 1947, apud HOOYKAAS & SCHILPERDORT, 1992). Esse ferimento pode ser resultante de lesões provocadas por tratos culturais, geadas ou insetos, no caso de plantas em condições de campo, ou então provocado por corte do tecido quando a infecção ocorre em condições de laboratório, pela manipulação "in vitro". As células vegetais quando lesadas passam a exsudar compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos em resposta ao ferimento e as bactérias são atraídas por esses compostos, multiplicando-se e fixando-se nas paredes celulares (LIPPINCOTT & LIPPINCOTT, 1969, apud HOOYKAAS & SCHILPERDORT, 1992).

Outro fator importante para que ocorra a transferência de genes diz respeito à temperatura. Por serem características de solos de clima temperado, as *Agrobacterium* não infectam naturalmente as plantas nos solos brasileiros devido às altas temperaturas, e o mesmo é válido em se tratando de condições de laboratório. Segundo MOORE *et al.* (1979) para que o processo ocorra é necessário que haja um tipo de interação sensível ao calor. Além disso, a bactéria perde a sua capacidade infecciosa quando exposta a temperaturas elevadas durante algumas horas.

Uma das primeiras etapas na indução do tumor refere-se à ativação coordenada do sistema de virulência, regulado pelos genes *vir*, que são ativados quando a bactéria, próxima às células lesadas, percebe as substâncias liberadas pela planta (STACHEL & ZAMBRYSKI, 1986). Os genes *vir* são expressos em níveis muito baixos nas *Agrobacterium* sob condições normais. Quando esses genes são expostos aos exsudatos de ferimentos das células (compostos fenólicos de baixo peso molecular, tais como aceto-siringona ou hidróxi-aceto-siringona) passam a ser ativados em vários níveis, em um processo lento que leva de 8 a 16 horas para alcançar os níveis máximos de expressão (STACHEL *et al.*, 1985; SPENCER & TOWERS, 1988; HOOYKAAS & SCHILPERDORT, 1992). Outras evidências sugerem que também alguns flavonóides conhecidos como indutores *nod* em *Rhizobium* podem agir como indutores dos genes *vir* (ZERBACK *et al.*, 1989).

Com a ativação dos genes *vir* ocorre a transferência da região-T do plasmídeo para a planta e a expressão do T-DNA após a integração no genoma vegetal. Depois de algum tempo o tumor começa a desenvolver-se devido às divisões celulares estimuladas pela produção, comandada pelo T-DNA, de auxinas e citocininas. Estes hormônios, embora sendo moléculas orgânicas relativamente simples são poderosos agentes de crescimento que controlam vários aspectos relativos à proliferação, alongamento e diferenciação celulares. Como consequência de um balanço hormonal desregulado induzido pelo T-DNA, a multiplicação celular torna-se descontrolada iniciando-se o desenvolvimento do tumor.

Com a integração e expressão do T-DNA no genoma da planta hospedeira as células contendo esse T-DNA passam a produzir e excretar as opinas que são consumidas especificamente pela bactéria colonizadora (por exemplo: cepas produtoras de octopina podem metabolizar octopina, mas não nopalina, enquanto cepas produtoras de nopalina metabolizam nopalina, mas não octopina). A ação das opinas não se limita à indução da atividade dos genes responsáveis pelo seu catabolismo, porém também age estimulando e ativando o sistema de transferência conjugativa do Ti/Ri plasmídeo, fazendo com que Ti/Ri plasmídeos sejam amplamente disseminados dentro de uma população de *Agrobacterium* em um tumor vegetal (HDOYKAAS & SCHILPEROORT, 1992). Como as *Agrobacterium* exploram as células vegetais induzindo-as a produzir compostos que são de seu uso específico, e fazendo isso através de engenharia genética, o processo vem sendo denominado "colonização genética" (Figura 5).



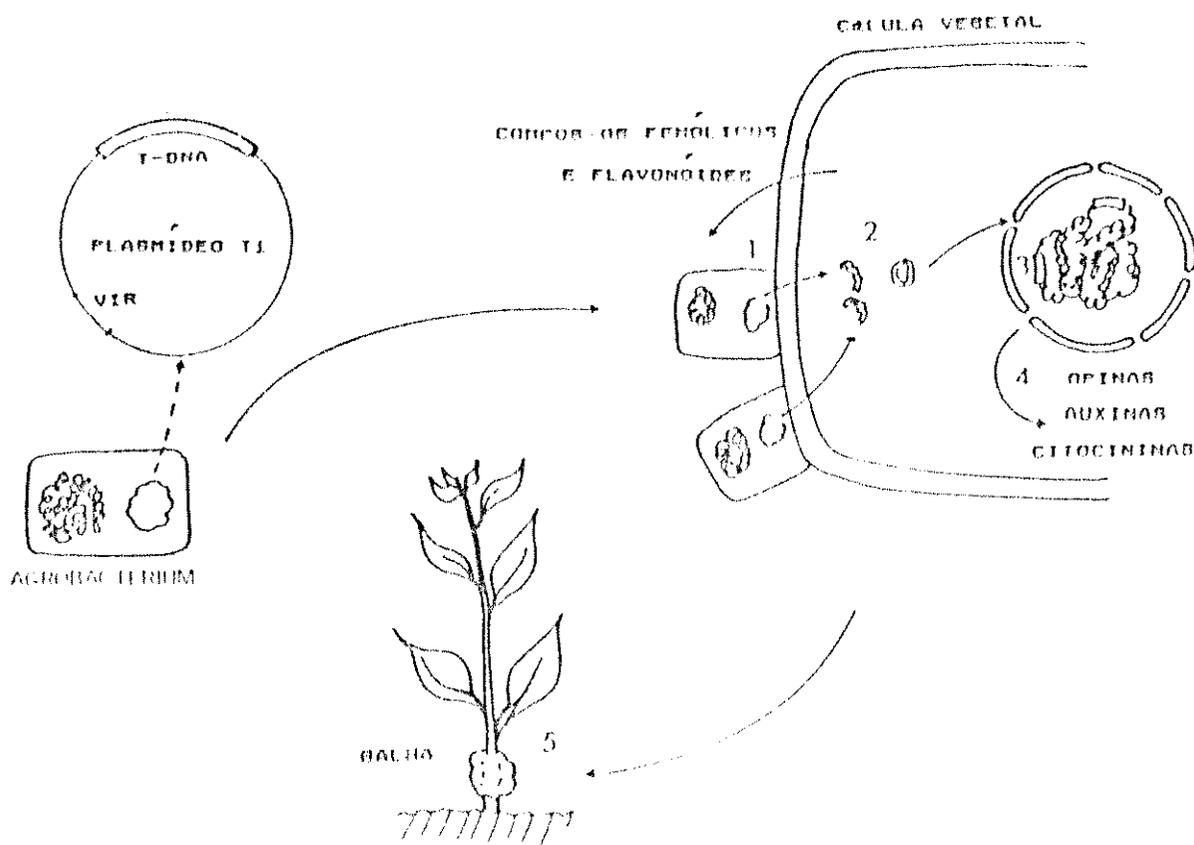


FIGURA 5 - Representação esquemática do processo de colonização genética, com o *Agrobacterium tumefaciens* contendo DNA cromossômico e Ti plasmídeo: (1) Fixação da bactéria na célula vegetal, próxima à região do ferimento. (2) Transferência do T-DNA à célula vegetal por ação da região de virulência (*vir*). (3) Integração do T-DNA ao genoma da célula vegetal. (4) Transcrição e translação do T-DNA. (5) Indução da divisão celular na região do ferimento, resultando na formação do tumor (galha). (Extraído de JONES & LINDSEY, 1988).

Ao longo dos anos, devido às observações durante as tentativas de transformação nas mais variadas espécies vegetais, os cientistas passaram a assumir de forma quase generalizada que a maioria das espécies suscetíveis à infecção pelas *Agrobacterium* seriam dicotiledôneas, apesar da existência de citações de transformação em plantas monocotiledôneas (JONES & LINDSEY, 1988; BINNS, 1990; HUNTER & NEILL, 1990; RAINERI *et al.*, 1990). No entanto, sabe-se que a formação do tumor ou o aparecimento das raízes transformadas é o resultado final de um complexo processo que envolve uma série de etapas (entre elas o reconhecimento das células feridas pelo *Agrobacterium*, a fixação das bactérias à planta, a transferência do T-DNA, sua expressão e integração no genoma da planta) e que o fato de não haver manifestação dos sintomas não significa que a transformação não ocorreu. Podem existir alterações no processo, como superprodução de fitohormônios inibindo a divisão celular, ou expressão incompleta dos genes para a produção dos fitohormônios, e nesses casos a ocorrência da transformação somente será verificada pela detecção das opinas correspondentes à cepa da bactéria, e não mais por observação visual. Essa transformação acompanhada de ausência na manifestação dos sintomas foi observada para várias espécies de monocotiledôneas, entre elas *Chlorophytum* e *Narcissus* (HOOYKAAS-VAN SLOGTEREN *et al.*, 1984), *Zea mays* (GRAVES & GOLDMAN, 1986; GRIMSLEY *et al.*, 1987), *Dioscorea bulbifera* (SCHAFER *et al.*, 1987), *Triticum aestivum* e *Hordeum vulgare* (BOULTON *et al.*, 1989). Apesar de a eficiência do sistema variar de acordo com a espécie verificou-se que a transformação ocorre também em monocotiledôneas, confirmando que o sistema de transferência pelo T-DNA pode ser explorado para a introdução de DNA estrangeiro em uma grande variedade de espécies vegetais.

3.3.4. *Agrobacterium rhizogenes* e o sistema de transformação: características particulares

Embora a transformação genética das células da planta hospedeira também represente a base da síndrome de raízes em cabeleira, este processo apresenta-se com algumas particularidades quando comparada com os tumores do tipo galha da coroa induzidos nas plantas através da infecção pelo *Agrobacterium tumefaciens*. Os tumores do tipo galha da coroa consistem em uma mistura de células vegetais transformadas (contendo T-DNA) e células normais que representam a maior proporção das células do tumor, sendo portanto tecidos quiméricos. Isso ocorre porque as enzimas codificadas pelos genes do T-DNA para a síntese de auxinas e citocininas causam a modificação no crescimento tanto das células transformadas quanto das células normais associadas a elas (VAN SLOGTEREN *et al.*, 1983; INZE *et al.*, 1984). Por outro lado, as raízes em cabeleira induzidas através de infecção por *Agrobacterium rhizogenes* são compostas somente por células transformadas, constituindo assim clones celulares (CHILTON *et al.*, 1982; DAVID *et al.*, 1984; BERCETCHE *et al.*, 1987). Enquanto os tumores induzidos pelo *Agrobacterium tumefaciens* crescem desordenadamente, as raízes em cabeleira proliferam-se geralmente de modo organizado (embora descontrolado), resultando em uma abundante produção de raízes no local da inoculação. A natureza clonal das raízes em cabeleira, aliada ao fato de que estas apresentam um fenótipo bastante específico e facilmente distinguível das células normais torna relativamente fácil o isolamento das raízes transformadas. O contrário ocorre nos tumores do tipo galha de coroa, onde para obter-se uma população constituída unicamente de células transformadas é necessário trabalhar com infecções únicas, como cocultivando protoplastos com *Agrobacterium* e regenerando esses protoplastos posteriormente.

As raízes em cabeleira apresentam um fenótipo bem definido em relação às raízes normais de uma mesma espécie

sendo que, quando cultivadas "in vitro", em geral crescem mais rapidamente que as culturas normais, apresentando alta incidência de ramificações e ausência de geotropismo (DAVID *et al.*, 1984). Na maioria dos casos esse próprio fenótipo característico apresentado pelas raízes transformadas quando cultivadas "in vitro" pode ser considerado como um bom marcador genético para a transformação.

Os plasmídeos Ti e Ri apresentam algumas diferenças básicas entre si, sendo que as mais marcantes localizam-se nos T-DNA que não são homólogos entre si, exceto pelos genes envolvidos na síntese de auxinas e citocininas (JOUANIN, 1984; DE PAOLIS *et al.*, 1985), estando essas diferenças relacionadas à capacidade de regeneração apresentada pelos tecidos transformados. A regeneração de plantas a partir de tumores do tipo galha de coroa apresenta-se bastante difícil de ser obtida, devendo sempre vir acompanhada de rearranjos importantes na estrutura do seu T-DNA (WULLEMS *et al.*, 1981). Por outro lado, consegue-se com uma certa facilidade obter a regeneração a partir de culturas "in vitro" de raízes transformadas, podendo esta ocorrer espontaneamente ou através de modificações apropriadas no meio de cultura. Como é aceito de modo geral o fato de que o T-DNA não sofre modificações durante o processo de regeneração das raízes transformadas (DAVID *et al.*, 1984), a facilidade com que os regenerantes são obtidos a partir dessas raízes indica que a presença do T-DNA do Ri plasmídeo é compatível com esse processo. As plantas regenerantes frequentemente passam a exibir um fenótipo característico, com internódios curtos, redução da dominância apical de raízes e de parte aérea, alteração da morfologia de folhas e flores, e redução na produção de pólen e sementes. Esse fenótipo alterado das plantas regenerantes varia de acordo com a espécie e com o processo da transformação ocorrido, podendo ser mais ou menos pronunciado de acordo com esses dois fatores (TEPFER, 1984; DAVID & TEMPÉ, 1988).

Outro fator a ser citado refere-se à capacidade

virulenta das diferentes cepas de *Agrobacterium rhizogenes* que varia de modo que algumas cepas apresentam-se mais eficientes que outras no processo de infecção. A eficiência das cepas difere não somente quanto à quantidade de espécies vegetais que são capazes de infectar, como também com relação às respostas de inoculação em diferentes partes das plantas de uma mesma espécie. As cepas de *Agrobacterium rhizogenes* que apresentam Ri plasmídeos tipo agropina (cepas A4, 1855, 15834, entre outras) carregam e inserem no hospedeiro duas regiões T-DNA denominadas T_L-DNA e T_R-DNA (JOUANIN, 1984; DE PAOLIS *et al.*, 1985) e apresentam-se mais virulentas que outras tipo manopina (B196, TR107) ou cucumopina (NCPB2659), que carregam somente uma região T-DNA (CHILTON *et al.*, 1982; COMBARD *et al.*, 1987). A região T_R-DNA carrega genes que codificam a biossíntese de auxinas e agropinas (DE PAOLIS *et al.*, 1985) e a região T_L-DNA é homóloga à região-T única das cepas dos outros tipos (SPANIO *et al.*, 1982; COMBARD *et al.*, 1987). Ambas as regiões possuem funções rizogênicas tendo sido demonstrado que os genes envolvidos na biossíntese de auxinas (região do T_R-DNA) são os responsáveis pela diferenciação primária das raízes após a infecção, enquanto os genes localizados na região do T_L-DNA respondem pela proliferação contínua de raízes, característica fenotípica das raízes transformadas. A ação combinada das duas regiões de T-DNA das cepas mais virulentas passa a produzir uma melhor resposta infectiva em comparação a outras cepas menos virulentas, devido ao fato de que as cepas mais virulentas (tipo agropina) conseguem induzir o início da síntese de auxinas nas células hospedeiras, enquanto as outras cepas não apresentam tal capacidade (CARDARELLI *et al.*, 1985; 1987; VILAINE & CASSE-DELBART, 1987).

3.3.5. Utilização das raízes transformadas para produção de metabólitos secundários

O cultivo de raízes transformadas obtidas a partir da inoculação pelo *Agrobacterium rhizogenes* apresenta-se viável para a obtenção de vários compostos secundários derivados de raízes de plantas. Como as culturas de raízes transformadas apresentam, além de elevada produtividade devida às altas velocidades de crescimento, uma boa estabilidade genética e bioquímica, observamos nos últimos anos um aumento nas tentativas de desenvolvimento de protocolos viáveis para a produção de metabólitos secundários com aplicações químicas e farmacêuticas. Muitos desses compostos possuem um valor de mercado suficientemente elevado (mais de 1000 US\$/kg), justificando a sua exploração mesmo para culturas que apresentem uma capacidade de síntese pequena (HAMILL *et al.*, 1987). Porém, apesar da existência de várias informações a respeito da acumulação de metabólitos secundários nos diferentes órgãos vegetais, ainda não dispomos de conhecimentos suficientes sobre como e onde esses produtos são sintetizados nas plantas, tornando-se difícil prever o potencial das culturas de raízes transformadas para a produção de um composto específico.

Os compostos sintetizados em cultura pelas raízes transformadas normalmente limitam-se àqueles produzidos pelas raízes das plantas normais em uma mesma espécie (HAMILL *et al.*, 1986; KAMADA *et al.*, 1986) e as eventuais diferenças provavelmente são devidas à ausência dos efeitos normais de transporte nas plantas inteiras. Segundo ENDRESS (1994), a produção dos compostos secundários em culturas de raízes transformadas ocorre exclusivamente como efeito da rizogênese relacionada à morfologia alterada dessas raízes. Embora a cinética da produção de metabólitos secundários em cultura ainda seja pouco conhecida, a acumulação dos compostos produzidos em algumas espécies estudadas segue um padrão onde a síntese parece ocorrer somente em segmentos da raiz transformada que apresentem

uma idade fisiológica específica (HAMILL *et al.*, 1986). Existem relatos de que, para raízes transformadas de plantas produtoras de alcalóides a maturidade do sistema radicular pode ser um fator importante para a produção (ENDO & YAMADA, 1985; HASHIMOTO *et al.*, 1986). KENNEDY *et al.* (1993) citam estudos comparando secções com idade e diâmetro semelhantes de raízes normais e transformadas de *Artemisia dracuncululus*, verificando que as raízes transformadas apresentam-se muito menos maduras que as raízes normais. No entanto PAYNE *et al.* (1987) demonstrou síntese de hiosciamina em culturas de raízes transformadas de *Datura stramonium* continuando mesmo após cessado o crescimento da cultura, sendo essa uma característica bastante desejável no caso de cultivos para fins comerciais.

Embora as culturas de raízes não-transformadas também possam ser utilizadas para a produção de compostos secundários, para muitas espécies a produção e manutenção da cultura apresenta-se difícil e a suplementação de auxina necessária para otimizar o crescimento pode causar diminuição na produção dos metabólitos secundários (HASHIMOTO *et al.*, 1986; NORTON & TOWERS, 1986). Uma das grandes vantagens do cultivo de raízes transformadas são os altos níveis de produtividade em relação aos metabólitos secundários. Como a transformação normalmente não afeta as quantidades relativas de compostos secundários sintetizados e as concentrações geralmente encontram-se nos mesmos níveis que nas raízes não transformadas (ENDRESS, 1994), as diferenças básicas referem-se à taxa de crescimento das culturas e aos níveis de produção constantes. O cultivo de raízes transformadas é vantajoso pois origina culturas de crescimento mais rápido que de raízes normais, sem necessidade de adição de fitohormônios e sem decréscimo na produção de compostos.

Outra característica importante diz respeito ao número de cromossomos das raízes transformadas, que permanece idêntico ao da planta parental da qual origina-se a cultura. Essa estabilidade mantém-se durante várias gerações e garante a preservação da integridade estrutural do sistema das raízes,

resultando em níveis de crescimento e de síntese de compostos secundários igualmente estáveis durante longos períodos (HAMILL *et al.*, 1987). Como exemplos dessa estabilidade da síntese KO *et al.* (1988) citam culturas de raízes transformadas de *Hyoscyamus niger* e *Nicotiniana rustica* apresentando um padrão constante de produção de alcalóides durante um ano e excretando no meio de cultura 20 a 30% da quantidade total de compostos sintetizados. Também ENDRESS (1994) descreve culturas de raízes transformadas de *Lithospermum erythrorhizon* com as mesmas características de estabilidade descritas acima.

Potencialmente, as culturas de raízes transformadas podem ser obtidas e produzir metabólitos secundários de interesse comercial a partir de qualquer espécie vegetal cuja produção ocorra nas raízes e cujos tecidos apresentem resposta à inoculação pelo *Agrobacterium rhizogenes*. A tabela 1 mostra as espécies nas quais as tentativas de transformação foram bem sucedidas e os compostos obtidos de cada cultura. Longe de ser definitiva, a variedade de espécies citada apenas confirma o potencial dessa técnica que deve continuar a ser desenvolvida para que possam ser produzidas cada vez mais substâncias que contribuam para melhorar a qualidade de vida para todos nós.

Tabela 1. Compostos secundários produzidos em culturas estabelecidas de raízes após transformação por *Agrobacterium rhizogenes* (extraído de SAITO *et al.*, 1992).

CLASSES DE COMPOSTOS PRODUZIDOS	ESPECIES VEGETAIS
ALCALÓIDES TROPÂNICOS	<i>Atropa belladonna</i> , <i>A. caucasia</i> , <i>Calystegia sepium</i> , <i>Datura candida</i> , <i>D. chlorantha</i> , <i>D. ferox</i> , <i>D. fastuosa</i> , <i>D. innoxia</i> , <i>D. metel</i> , <i>D. meteloides</i> , <i>D. quercifolia</i> , <i>D. rosei</i> , <i>D. sanguinea</i> , <i>D. stramonium</i> , <i>D. wrightii</i> , <i>Duboisia leichardtii</i> , <i>D. nyoperooides</i> , <i>Hyoscyamus albus</i> , <i>H. aureus</i> , <i>H. bohemicus</i> , <i>H. desertorum</i> , <i>H. muticus</i> , <i>H. niger</i> , <i>H. pusillus</i> , <i>Scopolia carniolica</i> , <i>S. japonica</i> , <i>S. lurida</i> , <i>S. stramonifolia</i>
ALCALÓIDES NICOTÍNICOS	<i>Nicotiniana africana</i> , <i>N. cavicola</i> , <i>N. hesperis</i> , <i>N. rustica</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>N. umbratica</i> , <i>N. velutina</i>
ALCALÓIDES INDÓIS	<i>Amsonia elliptica</i> , <i>Catharanthus roseus</i> , <i>C. trichophyllus</i>
OUTROS ALCALÓIDES	<i>Cinchona ledgeriana</i> (alcalóides quinolinicos), <i>Lobelia inflata</i> (lobelina), <i>Spartium junceum</i> (alcalóides lupínicos), <i>Solanum tuberosum</i> (alcalóides esterbides)
TERPENÓIDES	<i>Digitalis lanata</i> , <i>D. purpurea</i> (cardenolídeos), <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (glicirrizina), <i>Lippia dulcis</i> (hernandulcina e outros mono e sesquiterpenos), <i>Panax ginseng</i> (saponinas)
ANTRAQUINONAS	<i>Cassia torosa</i> , <i>C. obtusifolia</i> , <i>C. occidentalis</i> , <i>Rubia tinctorum</i>
OUTROS COMPOSTOS	<i>Beta vulgaris</i> (pigmentos betaláinicos), <i>Echinacea purpurea</i> (alcamidas), <i>Geranium thumbergii</i> (taninos), <i>Lithospermum erythrorhizon</i> (shinkonina), <i>Swertia japonica</i> (xantonas e amarogentina) <i>Tagetes patula</i> (tiophenes)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal (Planta Superior)

As plantas de *Artemisia annua* L. utilizadas como fonte inicial de explantes para este trabalho foram germinadas "in vitro" a partir de sementes coletadas de campos experimentais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas (CPQBA/UNICAMP), localizado em Paulínia, SP. Para todos os experimentos as sementes foram coletadas no mês de junho de 1993, de plantas de origem chinesa e já aclimatadas e selecionadas no próprio CPQBA, sendo as sementes provenientes de uma população selecionada para a característica de florescimento aos 3 meses de idade (florescimento médio a tardio para as nossas condições de clima e fotoperíodo). As sementes foram armazenadas em condições constantes de temperatura (10°C) e umidade (70%).

4.2. Material bacteriológico (*Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*)

4.2.1. Descrição do material bacteriológico utilizado

Foram utilizados nestes experimentos 2 cepas selvagens de *Agrobacterium rhizogenes* (8196 e 15834), e uma cepa selvagem de *Agrobacterium tumefaciens* (C58), cedidas pelo Laboratório de Biologia Celular de Plantas do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, SP.

4.2.2. Manutenção das bactérias

As repicagens de manutenção das bactérias foram feitas utilizando-se alça de platina, em placas de petri de 9,0 cm de diâmetro, cada placa contendo aproximadamente 10 ml de meio AT (Tabela 2).

Após a repicagem das bactérias as placas foram mantidas no escuro, à temperatura de 25 ± 2 °C, durante cerca de 48 horas até o crescimento das colônias. Após o crescimento das colônias as placas eram embrulhadas em papel alumínio e mantidas a 5°C em geladeira durante 30 dias até uma nova repicagem.

4.2.3. Preparo das bactérias para inoculação

As bactérias mantidas a 5°C (em geladeira) foram novamente repicadas utilizando-se alça de platina, para meio AT em placas de petri de 9,0 cm de diâmetro. Após a repicagem as bactérias foram cultivadas durante aproximadamente 48 horas à temperatura de 25 ± 2 °C no escuro, para crescimento adequado das colônias estando, então, prontas para serem inoculadas em plantas superiores.

Tabela 2. Meio AT para cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*

KH_2PO_4	10900,0 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	160,0 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,0 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 mg/l
Extrato de levedura	50,0 mg/l

Difco bacto-ágar	20,00 g/l
------------------	-----------

Sacarose	2,00 g/l
----------	----------

pH = 7,3

Esterilizar por 30 minutos à 120°C.

4.3. Metodologia de transformação da planta medicinal *Artemisia annua* L.

4.3.1. Esterilização das sementes de *Artemisia annua*

A esterilização das sementes de *Artemisia annua* L. a serem cultivadas "in vitro" foi feita acondicionando-as em saquinhos de pano fino estéreis que foram imersos em uma solução a 1% de fungicida (marca comercial Benlate, grupo químico benzimidazol). Após 10 minutos, eram passados por álcool 70% durante 20 segundos e imersos em uma solução a 1% de NaOCl (hipoclorito de sódio P.A. 5-6%) por 12 minutos. Em todas as soluções foram adicionados 0,1 ml de agente espalhante (Tween 20 v/v) e o recipiente foi mantido sob agitação constante durante todo o processo de esterilização. Após a esterilização foram feitas três lavagens das sementes com água destilada estéril.

As sementes esterilizadas foram retiradas do saquinho e colocadas para secar sobre papel de filtro estéril em placas de petri, durante 1 hora em condições assépticas.

Todo o processo de esterilização descrito, desde o acondicionamento das sementes nos saquinhos até a secagem das sementes esterilizadas superficialmente foi executado em câmara de fluxo laminar horizontal HLFS12 marca Veco.

4.3.2. Cultivo da planta medicinal *Artemisia annua*

Para inoculação e cultivo das sementes de *Artemisia annua* L. foi utilizado o meio de sais minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962), tendo como fonte de carboidratos sacarose na concentração de 30 g/l. Este meio foi denominado MEIO 1 (Tabela 3). A concentração de ágar utilizada foi de 7 g/l e o pH foi ajustado para o valor de 5,8 anteriormente à autoclavagem. Não houve adição de reguladores de crescimento em nenhuma das

etapas de germinação das sementes e cultivo de plântulas de *Artemisia annua* L. "in vitro".

Após a preparação o MEIO 1 foi distribuído em frascos de vidro de 200 ml, na proporção de 25 ml de meio por cada frasco e esterilizados em autoclave, à temperatura de 120°C e pressão de 1 kgf/cm² durante 20 minutos.

Após a inoculação das sementes nos frascos contendo o MEIO 1 estes foram mantidos à temperatura de 25 ± 2°C, sob luz branca incandescente (intensidade 3000 lux) em fotoperíodo de 16 horas. Após a germinação das sementes, os brotos foram mantidos nas mesmas condições de meio e de cultivo por 4 meses até apresentarem cerca de 3 cm de comprimento, sendo efetuadas repicagens a cada 30 dias.

Tabela 3. MEIO 1 para cultivo de artemisia (*Artemisia annua* L.).

NH ₄ NO ₃	1650,0 mg/l	H ₃ BO ₃	6,200 mg/l
KNO ₃	1900,0 mg/l	MnSO ₄ .7H ₂ O	22,300 mg/l
CaCL ₂ .2H ₂ O	440,0 mg/l	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0 mg/l	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,250 mg/l
KH ₂ PO ₄	170,0 mg/l	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/l
Na ₂ EDTA	37,3 mg/l	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg/l	KI	0,830 mg/l

Inositol	100,0 mg/l
Ácido Nicotínico	0,5 mg/l
Piridoxina HCl	0,5 mg/l
Tiamina HCl	0,1 mg/l
Glicina	2,0 mg/l

Difco bacto-ágar	7,0 g/l
Sacarose	30,0 g/l

pH = 5,8

Esterilizar por 20 minutos à 120°C.

4.3.3. Preparo da planta medicinal *Artemisia annua* e inoculação com o *Agrobacterium*

Os brotos com cerca de 3 cm de comprimento foram removidos do meio nutritivo, sendo separadas estacas com eixo principal, sem o ápice e sem as raízes, com 2 ou 3 pares de folhas. Estas estacas foram colocadas com a extremidade basal para cima e a extremidade apical em contato com o ágar, conforme indicado na Figura 6, em meio estéril contendo apenas água destilada e ágar na concentração de 7,0 g/l (Tabela 4), denominado MEIO 2, sendo acertado o valor de pH 5,8 anteriormente à autoclavagem. Para esta etapa foram utilizados frascos de vidro com 7,0 cm de altura por 5,5 cm de diâmetro.

Foram inoculadas nas estacas de *Artemisia annua* L. as seguintes cepas de *Agrobacterium*:

1. *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58.
2. *Agrobacterium rhizogenes* cepa 8196.
3. *Agrobacterium rhizogenes* cepa 15834.

Cada uma das cepas foi inoculada, individualmente, em 10 estacas, totalizando 30 estacas por inoculação. Para a inoculação as estacas foram retiradas do frasco com o auxílio de uma pinça, colocadas em contato com a colônia de bactérias e recolocadas logo em seguida dentro do frasco original. Todo este procedimento foi executado em câmara de fluxo laminar HLFS12 marca Veco. O material de *Artemisia annua* L. inoculado com os *Agrobacterium* foi mantido à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob luz branca incandescente (intensidade 3000 lux) em fotoperíodo de 16 horas. Também foram mantidos nas mesmas condições de cultivo frascos-controle contendo material vegetal (*Artemisia annua* L.) não inoculado para fins de comparação.

Tabela 4. Meio 2 para cultivo de artemisia (*Artemisia annua* L.).

Água destilada	1,00 l
Difco bacto-ágar	7,00 g

pH = 5,8

Esterilizar por 20 minutos à 120°C.

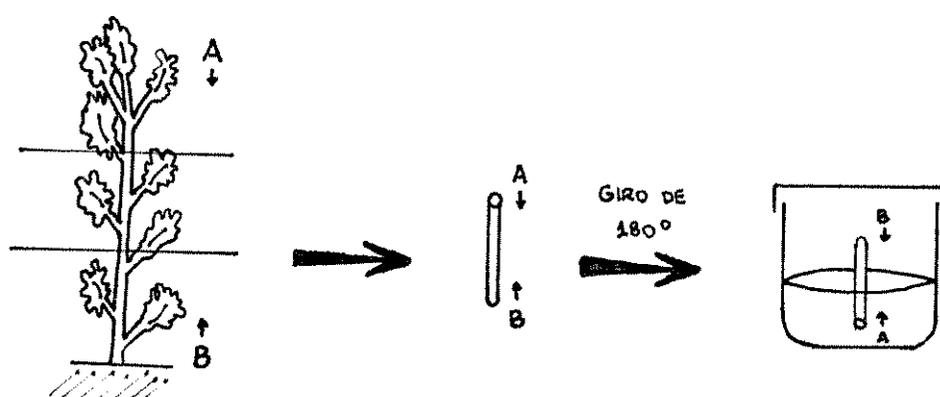


FIGURA 6 - Esquema de corte e inoculação no meio de cultura das estacas de artemisia nos frascos, com a extremidade basal para cima e a extremidade apical em contato com o ágar.

4.3.4. Isolamento das raízes transformadas obtidas da planta medicinal *Artemisia annua* L.

Cerca de 30 dias após a inoculação das estacas de *Artemisia annua* L. com o *Agrobacterium rhizogenes* começam a surgir primórdios das raízes no ponto de inoculação. Inicialmente verifica-se um inchaço na região da inoculação, que transforma-se mais tarde em raízes diferenciadas. Após o aparecimento das raízes, e estando estas crescidas com cerca de 1 cm de comprimento, passou-se a fazer a excisão e o isolamento destas raízes em placas com meio de cultura contendo antibiótico (cefotaxime, marca comercial Claforan) visando impedir o crescimento e proliferação do *Agrobacterium rhizogenes*.

Para o isolamento foram testadas duas concentrações de antibiótico para um mesmo meio de cultura, com a finalidade de determinar o procedimento ideal para o isolamento das raízes transformadas de *Artemisia annua* L.. O meio de cultura utilizado foi o meio de sais minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962) com a concentração de macronutrientes reduzida à metade (MS½), denominado MEIO 3 (Tabela 5).

As duas concentrações testadas para o antibiótico cefotaxime foram:

- a) 100 µg/ml de meio de cultura.
- b) 250 µg/ml de meio de cultura.

Os meios de cultura foram distribuídos em placas de petri de 9,0 cm de diâmetro, para onde transferiu-se as raízes excisadas das estacas de *Artemisia annua* L.. Delimitou-se, na ocasião, o comprimento original (comprimento zero) de cada uma das raízes no verso de cada placa. Estas placas foram, então, mantidas no escuro à temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As culturas destas raízes transformadas foram repicadas 2 vezes em intervalos de 45 dias, para meio de cultura contendo antibiótico.

4.3.5. Cultivo das raízes em meio sólido após a transformação

Após três passagens por meio de cultura contendo antibiótico as raízes já apresentavam-se livres de qualquer contaminação pelo *Agrobacterium rhizogenes*, podendo-se passar a cultivá-las em meio de cultura sem antibiótico. Nesta etapa foram testadas duas formulações de meio de cultura tendo como finalidade a otimização do cultivo em meio sólido das raízes transformadas.

Em uma primeira etapa dos testes utilizou-se meio de sais minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962) com a concentração de macronutrientes reduzida à metade, denominado MS½, sendo mantidas as concentrações dos outros componentes do meio (MEIO 3). Para a segunda fase dos testes foi utilizado meio de sais minerais de WHITE (1943) modificado utilizando-se a concentração de FeEDTA do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) e com sacarose na concentração de 30 g/l, denominado MEIO 4 (Tabela 6). Em ambas as etapas utilizou-se ágar na concentração de 7,0 g/l e o cultivo foi conduzido em placas de petri de 9,0 cm de diâmetro. As placas foram mantidas no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e as repicagens foram efetuadas a cada 45 dias.

Tabela 5. Meio 3 (MS½) para cultivo de raízes transformadas de artemisia (*Artemisia annua* L.).

NH ₄ NO ₃	825,0 mg/l	H ₂ BO ₃	6,200 mg/l
KNO ₃	950,0 mg/l	MnSO ₄ .7H ₂ O	22,300 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	220,0 mg/l	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,0 mg/l	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,250 mg/l
KH ₂ PO ₄	85,0 mg/l	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/l
Na ₂ EDTA	37,3 mg/l	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 mg/l	KI	0,830 mg/l

Inositol	100,0 mg/l
Ácido Nicotínico	0,5 mg/l
Piridoxina HCl	0,5 mg/l
Tiamina HCl	0,1 mg/l
Glicina	2,0 mg/l

Difco bacto-ágar	7,0 g/l
Sacarose	30,0 g/l

pH = 5,8

Esterilizar por 20 minutos à 120°C.

Tabela 6. Meio 4 (White modificado) para cultivo de raízes transformadas de artemísia (*Artemisia annua* L.).

KNO_3	80,0 mg/l	H_2BO_3	1,50 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	720,0 mg/l	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5,00 mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	300,0 mg/l	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,00 mg/l
Na_2SO_4	200,0 mg/l	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,5 mg/l	KI	0,75 mg/l
KCl	65,0 mg/l	MoO_3	0,01 mg/l
Na_2EDTA	37,3 mg/l		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 mg/l		

Ácido Nicotínico	0,5 mg/l
Piridoxina HCl	0,1 mg/l
Tiamina HCl	0,1 mg/l
Glicina	3,0 mg/l

Difco bacto-ágar	7,0 g/l
Sacarose	30,0 g/l

pH = 5,8

Esterilizar por 20 minutos à 120°C.

4.3.6. Cultivo das raízes em meio líquido após a transformação

Após o estabelecimento do cultivo em meio sólido passou-se aos testes para cultivo das raízes em meio líquido. Raízes cultivadas em meio sólido (MEIO 4) foram transferidas para meio de sais minerais de WHITE (1943) líquido, com sacarose na concentração de 30 g/l (MEIO 4 sem adição de ágar). O meio foi distribuído em erlenmeyers de 250 ml, na proporção de 100 ml de meio para cada erlenmayer. Os recipientes foram, então, mantidos sob agitação constante em agitador orbital, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob luz branca incandescente (intensidade 3000 lux), fotoperíodo de 16 horas. As repicagens foram feitas em intervalos de 30 dias.

4.4. Análises químicas

A metodologia utilizada para estas análises foi descrita por FIGUEIRA (1995), tendo sido modificada a partir de PRAS *et al.* (1991).

4.4.1. Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados para as análises químicas dos extratos obedeceram, em todos os casos, ao padrão P.A. Para as análises por CCD (Cromatografia de Camada Delgada) foram utilizados os seguintes reagentes: tolueno (para obtenção do extrato bruto), metanol e di-cloro metano (na mistura de solventes da fase móvel), ácido acético glacial, ácido sulfúrico e 4-anisaldeído (para revelação).

Os extratos brutos analisados foram comparados com padrões de artemisinina, ácido artemisinínico e artenuína B nas seguintes concentrações: 1. artemisinina: 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 2.

ácido artemisinínico: 0,2 µg/µl; e 3. artenuína B: 0,5 µg/µl. Todos os padrões utilizados para as análises foram cedidos pelo Laboratório de Fitoquímica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA/UNICAMP).

4.4.2. Instrumental utilizado

Em todas as análises por CCD foram utilizadas cromatofolhas AL de silicagel 60 F₂₅₄, com espessura da camada de 0,2 mm, marca comercial Merck. Os extratos foram aplicados por microseringas Hewlett-Packard 9301-0246 com capacidade de 10 µl. Utilizou-se também uma cuba cromatográfica para o desenvolvimento dos cromatogramas e uma placa aquecedora para a visualização dos resultados.

4.4.3. Obtenção dos extratos

Após a separação do material vegetal a ser analisado (raízes normais e/ou transformadas) este era transferido para uma estufa de circulação forçada, para secagem utilizando-se temperatura constante de 30°C durante um período de 36 horas.

Com o material vegetal seco passou-se à pesagem de 100 mg de cada amostra seguida de maceração com 2 ml de tolueno P.A. durante 3 minutos. Após a maceração os volumes eram novamente completados para 2 ml obtendo-se os extratos brutos a serem analisados.

Também foram obtidos extratos provenientes do meio de cultura das raízes transformadas (MEIO 4 líquido) para verificação de possível liberação de compostos produzidos pelas raízes. Neste caso o extrato foi obtido utilizando-se como solvente o clorofórmio e separando-se a fase orgânica do meio com o auxílio de um funil de separação. Após a evaporação do solvente

obteve-se o extrato a ser analisado.

4.4.4. Análise dos extratos por CCD (cromatografia de camada delgada)

A aplicação dos extratos foi feita com microseringa nas cromatoplasas em quantidades de 7,0 μ l para os extratos e 3,0 μ l para os padrões de artemisinina, ácido artemisínico e artenuína B. Os cromatogramas foram desenvolvidos por corrida unidimensional ascendente, em cuba cromatográfica contendo solução de diclorometano : metanol (98,5 : 1,5).

Para a revelação dos cromatogramas utilizou-se uma solução de ácido acético glacial : ácido sulfúrico : 4-anisaldeído (50,0 : 1,0 : 0,5), por imersão durante 30 segundos. Após a revelação as placas foram aquecidas para permitir a visualização dos resultados.

4.5. Caracterização molecular das raízes de *Artemisia annua* transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* cepa 8196

4.5.1. Reagentes e materiais

Os reagentes utilizados foram todos provenientes da Sigma ou Merck.

O desoxirribonucleotídeo radioativo (α - 32 P)dCTP foi fornecido pela Amersham.

O "Kit Multiprimer" para marcação radioativa da sonda foi adquirido da Gibco.

A resina Sephadex G-50 fina foi produzida pela Sigma (número de catálogo S-5897).

As endonucleases de restrição foram adquiridas da Pharmacia.

As membranas de nylon utilizadas para o "Dot Blot" e para o "Southern Blot" foram as "Gene Screen Plus" Hybridization Transfer Membrane produzidas pela DuPont.

O filme de raio-X e as soluções para revelação e fixação do filme da membrana foram fornecidas pela Kodak.

4.5.2. Soluções-estoque utilizadas

Todas as soluções-estoque utilizadas foram preparadas de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989).

- * β -mercaptoetanol: estoque 14,4 M.
- * KOAc: estoque 5 M.
- * Brometo de etídeo: estoque 10 mg/ml.
- * NaOH: estoque 10 N.
- * NaCl: estoque 5 M.
- * NaOAc: estoque 3 M.
- * Tris HCl pH 7,5: estoque 1 M.
- * Tris pH 8,0: estoque 1 M.
- * EDTA pH 8,0: estoque 0,5 M.
- * SDS: estoque 20X.
- * SSC: estoque 20X.

4.5.3. Extração de DNA vegetal

A extração de DNA das raízes transformadas e também de material vegetal (planta) não transformado para controle foi feita segundo metodologia descrita por DELLAPORTA *et al.* (1983). Esta metodologia consiste em uma minipreparação de DNA vegetal simples e rápida, apropriada para quantidades de material entre 0,5 e 2,0 g, sendo 1 g considerada a quantidade ideal.

* Soluções:

- I - Tampão de extração: 50 mM Tris, pH 8
10 mM EDTA, pH 8
100 mM NaCl
1% SDS
10 mM β -mercaptoetanol
- II - KOAc 5M
- III - Isopropanol
- IV - Etanol 80%
- V - Tampão TE: 10 mM Tris, pH 8
1 mM EDTA, pH 8

** Procedimento:

O material vegetal foi pesado e macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó muito fino e homogêneo. Transferiu-se então as amostras maceradas para tubos de 50 ml adicionando-se 7 ml do tampão de extração em cada tubo e misturando-se vagarosamente até o macerado voltar à temperatura ambiente. A seguir o material foi incubado a 65°C durante 30 minutos, em banho-maria. Após esse período foram adicionados para cada amostra 2,5 ml de KOAc 5M, agitando-se delicadamente. Após a agitação o material foi mantido em gelo durante 30 minutos.

A seguir os tubos foram centrifugados a 5000 rpm, a 4°C durante 30 min, (Superspeed RC-5B Sorvall, rotor SS34) para a separação da fração contendo o DNA. Após a centrifugação a

fase aquosa foi filtrada lentamente e coletada em tubo COREX de 50 ml contendo 5 ml de isopropanol. Cada tubo foi então invertido lentamente várias vezes para provocar uma precipitação do DNA. O precipitado foi recuperado após uma nova centrifugação a 5000 rpm, a 4°C durante 30 min, (Superspeed RC-5B Sorvall, rotor HS-4).

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 80%. Os tubos COREX foram colocados sobre a bancada em papel de filtro na posição invertida até a secagem do etanol. O DNA precipitado foi ressuscitado em 500 µl de tampão TE, misturando-se delicadamente até uma perfeita homogeneização. A remoção de resíduos contaminantes de RNA foi feita por adição de RNase às amostras na concentração final de 50 µg/ml, seguida de incubação em banho-maria a 37°C durante 1 hora. O material foi então transferido para tubos eppendorf e mantido em freezer a -18°C.

4.5.4. Estimativa da concentração de DNA obtida

* Soluções:

- I - Tampão TBE 20X: 1 M Tris, pH 8
1 M Ácido Bórico
20 mM EDTA, pH 8
- II - Brometo de etideo 5 mg/l

** Procedimento:

Para estimar-se a concentração de DNA obtida após a extração foi feita uma eletroforese em minigel de agarose, comparando-se os extratos obtidos com padrões de DNA de bacteriófago λ com concentração conhecida.

O DNA foi separado em gel de agarose 0,7% em tampão TBE 0,5X, durante 1 hora sob corrente de 34 V. O gel foi corado com 5 µl de Brometo de etideo 5 mg/l diluído em 20 ml de água destilada durante 20 min, sendo posteriormente lavado em

água destilada por 15 min em agitação constante. A visualização do DNA e a estimativa da concentração obtida foi possível após a exposição do gel à luz ultra-violeta.

4.5.5. Digestão do DNA

Para a caracterização molecular por "Southern Blot" houve a necessidade de digerir o DNA do material vegetal (as raízes transformadas e uma planta não transformada). A digestão foi efetuada com a endonuclease de restrição *EcoRI*. Utilizou-se 10 µg de DNA genômico de cada amostra e o procedimento da digestão foi conduzido conforme especificado pelo fabricante. Antes da digestão o DNA das amostras foi concentrado pela adição de 1/10 volume de NaOAc 3M e 1 volume de (DNA + NaOAc) de etanol absoluto. O volume total foi mantido durante 20 min em gelo seco e centrifugado a 5000 rpm, a 4°C durante 30 min, (Superspeed RC-5B Sorvall, rotor HS-4). O precipitado foi então lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris, pH 8 + 1 mM EDTA, pH 8) em 1/5 do volume inicial.

4.5.6. Marcação radioativa da sonda

* Soluções:

I - TE/SDS: 10 mM Tris, pH 8
1 mM EDTA, pH 8
0,5% SDS

II - "Kit Multiprimer" para marcação radioativa
marca comercial Gibco,
(contendo dATP, dGTP, dTTP, tampão,
"primers" e enzima).

**** Procedimento:**

A sonda utilizada nesta marcação foi o fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6 (subclone do pRiB196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI (ver figura 13). A purificação do fragmento utilizado como sonda foi feita por eletroeluição, segundo metodologia descrita por SAMBROOK *et al.* (1989). Para a marcação radioativa foram utilizados 100 ng de sonda e a desnaturação do DNA foi feita a 100°C durante 2 min. A incorporação do desoxirribonucleotídeo radioativo (α - 32 P)dCTP foi realizada utilizando-se o "Kit Multiprimer" em reação a 37°C durante 1 hora. Após esse período a sonda foi passada por uma coluna de resina Sephadex G-50 fina, montada em pipeta pasteur de aproximadamente 10 cm de comprimento e equilibrada com o tampão TE/SDS, para a eliminação dos nucleotídeos não incorporados durante a reação. A atividade utilizada de sonda por membrana foi de 4×10^5 cpm/ml de solução de hibridização.

4.5.7. Análise do DNA por "Dot Blot"**4.5.7.1. Preparação da membrana***** Soluções:**

I - Solução desnaturante: 1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

II - Solução de neutralização: 1,5 M NaCl
0,5 M Tris HCl
pH 7,5

**** Procedimento:**

Foram preparados 500 ng de DNA não digerido de cada amostra a ser analisada. As amostras de DNA foram desnaturadas por aquecimento, tendo sido submetidas à temperatura de 95°C durante 5 min e logo a seguir resfriadas sobre gelo durante 2 min. As amostras foram aplicadas sobre membrana de nylon ("Gene Screen Plus" hybridization transfer membrane, marca DuPont) em alíquotas de 2,5 µl tomando-se o cuidado de permitir que as amostras secassem totalmente entre as aplicações. Além das amostras de DNA das raízes foram aplicadas como controle negativo uma amostra de DNA de plântula de artemisia cultivada "in vitro" e uma amostra de DNA de bacteriófago λ . Como controle positivo foram aplicados 2 ng do fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6 (subclone do pRi8196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI. As amostras de DNA de bacteriófago λ e o fragmento do plasmídeo p6 utilizados nesta fase foram gentilmente cedidos pela Dra. Marie-Anne Van Sluys, do Departamento de Biologia, IB, Universidade de São Paulo.

Após a secagem total das amostras a membrana foi umedecida e mantida durante 5 min na solução desnaturante. Logo a seguir foi transferida para a solução de neutralização onde foi mantida também durante 5 min. Após esse período a membrana foi retirada da solução e colocada para secar sobre papel de filtro, onde foi deixada até que estivesse completamente seca (pelo menos 1 hora).

4.5.7.2. Hibridização da membrana*** Soluções:**

I - SSC 2X

II - Solução de Hibridização: SSC 5X

0,5% SDS

1% Leite em pó

desnatado (Molico)

**** Procedimento:**

A membrana foi previamente umedecida com SSC 2X sob agitação durante 2 min. Foi feita então uma pré-hibridização incubando-se a membrana em solução de hibridização (volume em ml igual a 20% da área da membrana em cm²) a 65°C durante 24 h sob agitação. Após esse período um volume de sonda (fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6, subclone do pRiB196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI (ver figura 13), marcado com o desoxirribonucleotídeo radioativo (α -³²P)dCTP) foi desnaturado adicionando-se 1/3 do volume da sonda de NaOH 10 N durante 5 min, sendo logo a seguir neutralizado por adição de 1 volume de (sonda + NaOH) de Tris 1 M pH 8,0 durante 5 min. O volume obtido foi adicionado à solução de hibridização. O processo de hibridização prosseguiu após a adição da sonda mantendo-se a membrana em incubação por mais 48 horas a 65°C sob agitação.

4.5.7.3. Lavagem da membrana e exposição*** Soluções:**

I - SSC 2X

II - Solução de lavagem: SSC 2X

1% SDS

**** Procedimento:**

Após a retirada da membrana da solução de hibridização procedeu-se às lavagens para eliminação da sonda não hibridizada. Primeiramente foram realizadas duas lavagens em SSC 2X à temperatura ambiente durante 5 min sob leve agitação. Após as duas lavagens, quando verificados níveis ainda elevados de radiação, foram realizadas mais duas lavagens em solução de SSC 2X + 1% SDS à 65°C durante 30 min.

A membrana lavada foi exposta a um filme de raio-X em chassi com intensificador, mantido em freezer a -70°C

duarnte 6 dias. A revelação do filme foi feita por imersão durante 3 min em revelador, seguida de imersão por 2 min em água e por 5 min em fixador, sendo então lavado em água corrente por 30 a 40 min e colocado para secar.

4.5.8. Análise do DNA por "Southern Blot"

4.5.8.1. Migração do DNA em gel de agarose

* Soluções:

- I - Tampão TBE 20X: 1 M Tris, pH 8
1 M Ácido Bórico
20 mM EDTA, pH 8
- II - Brometo de etídeo 5 mg/l

** Procedimento:

Para a separação das bandas de DNA após a digestão enzimática foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TBE 0,5X, durante 18 horas sob corrente de 20 V e 10 mA. O gel foi corado com 5 µl de Brometo de etídeo 5 mg/l diluído em 20 ml de água destilada durante 15 min, sendo posteriormente lavado em água destilada por 30 min em agitação constante.

4.5.8.2. Transferência alcalina do DNA para membrana

- * Soluções: I - Hidrólise: 0,25 N HCl
- II - Desnaturação: 0,4 N NaOH
0,6 M NaCl
- III - Neutralização: 0,5 M Tris, pH 8
1,0 M NaCl

**** Procedimento:**

O gel foi imerso em solução 0,25 N HCl e mantido durante 30 min sob agitação. Em seguida foi transferido para a solução II (NaOH/NaCl) onde foi mantido por 60 min, também sob agitação. Durante esse período, a membrana de nylon foi umedecida em água destilada e depois transferida para a solução II durante 10 min. O gel foi então retirado da solução II e colocado em posição invertida sobre um suporte coberto com papel de filtro, estando o papel de filtro com as pontas imersas na solução II. A membrana de nylon foi colocada com a face côncava em contato com o gel, dando início à transferência. Uma coluna formada por papel de filtro (3 folhas) e papel toalha com espessura de aproximadamente 10 cm foi colocada sobre a membrana e o gel e compactada com um peso de 500 g. A transferência foi realizada durante 16 horas, adicionando-se a solução II quando necessário. Após esse período a pilha foi desmontada e a membrana imersa na solução III (Tris/NaCl) por 30 min sob leve agitação, sendo seca a seguir em temperatura ambiente.

4.5.8.3. Hibridização da membrana*** Soluções:**

I - SSC 2X

II - Solução de Hibridização: SSC 5X

0,5% SDS

1% Leite em pó

desnatado

(Molico)

**** Procedimento:**

A membrana foi previamente umedecida com SSC 2X sob agitação durante 2 min. Foi feita então uma pré-hibridização incubando-se a membrana em solução de hibridização (volume em ml igual a 20% da área da membrana em cm²) a 65°C durante 24 h sob

agitação. Após esse período um volume de sonda (fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do plasmídeo p6, subclone do pRi8196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI (ver figura 13), marcado com o desoxirribonucleotídeo radioativo (α - 32 P)dCTP foi desnaturado adicionando-se 1/3 do volume da sonda de NaOH 10 N durante 5 min, sendo logo a seguir neutralizado por adição de 1 volume de (sonda + NaOH) de Tris 1 M pH 8,0 durante 5 min. O volume obtido foi adicionado à solução de hibridização. O processo de hibridização prosseguiu após a adição da sonda mantendo-se a membrana em incubação por mais 48 horas a 65°C sob agitação.

4.5.8.4. Lavagem da membrana e exposição

* Soluções:

I - SSC 2X

II - Solução de lavagem: SSC 2X
1% SDS

** Procedimento:

Após a retirada da membrana da solução de hibridização procedeu-se às lavagens para eliminação da sonda não hibridizada. Primeiramente foram realizadas duas lavagens em SSC 2X à temperatura ambiente durante 5 min sob leve agitação. Após as duas lavagens, quando verificados níveis ainda elevados de radiação, foram realizadas mais duas lavagens em solução de SSC 2X + 1% SDS à 65°C durante 30 min.

A membrana lavada foi exposta a um filme de raio-X em chassi com intensificador, mantido em freezer a -70°C durante 10 dias. A revelação do filme foi feita por imersão durante 3 min em revelador, seguida de imersão por 2 min em água e por 5 min em fixador. Em seguida o filme foi lavado em água corrente durante 30 a 40 min e colocado para secar.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Metodologia de transformação da planta medicinal *Artemisia annua* L.

5.1.1. Esterilização das sementes de *Artemisia annua*

O protocolo para esterilização das sementes de *Artemisia annua* L. foi desenvolvido tomando-se como referência WOERDENBAG *et.al.* (1993a), o qual descreveu o processo de esterilização pela imersão das sementes em etanol 70%, hipoclorito de sódio 3% por 20 min, seguidas de lavagem e secagem. Foram feitas modificações neste protocolo visando facilitar a manipulação das sementes adequando a esterilização às nossas condições de trabalho.

A primeira dificuldade sentida foi com relação ao tamanho bastante reduzido das sementes que faz com que a manipulação sem perdas seja praticamente impossível. Neste caso, optou-se por utilizar pequenos saquinhos de pano fino previamente esterilizados, onde as sementes eram acondicionadas para passarem pelos agentes esterilizadores. A grande contaminação por fungos observada após a execução das primeiras esterilizações foi resolvida com a utilização de fungicida (marca comercial Benlate, grupo químico benzimidazol) e no decorrer de diversas esterilizações optou-se por reduzir a concentração de hipoclorito para 1% durante 12 min, quando então as sementes passaram a germinar com maior eficiência. Após a inoculação das sementes o início da germinação era observado dentro de 2 ou 3 dias.

5.1.2. Cultivo da planta medicinal *Artemisia annua* L.

Ainda tomando-se como base os experimentos de WOERDENBAG *et.al.* (1993a) optou-se pelo cultivo utilizando-se o meio de sais minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962), porém sem a adição de fitorreguladores em nenhuma das etapas de germinação e cultivo. Durante 4 meses de cultivo as repicagens foram efetuadas a cada 30 dias. A plântula de *Artemisia annua* L. aos 4 meses de idade apresentava-se conforme a figura 7, estando então pronta para ser inoculada com os *Agrobacterium*.



Figura 7. Plântula de *Artemisia annua* L. aos 4 meses de idade, germinada e cultivada "in vitro".

5.1.3. Preparo da planta medicinal *Artemisia annua* L. e inoculação com o *Agrobacterium*

As estacas de *Artemisia annua* L. foram retiradas de plântulas com 4 meses de idade por observar-se que com essa idade as plântulas já apresentavam um crescimento vertical suficiente para que se pudesse obter uma estaca de comprimento razoável (cerca de 2 cm) após a retirada do ápice da plântula e a remoção das raízes. Algumas folhas foram mantidas nas estacas para que estas permanecessem, ao menos parcialmente, continuando a realizar normalmente as suas funções e tentando assim adiar uma possível murcha ou morte do material. A exemplo do modelo experimental realizado com tomate, as estacas de *Artemisia annua* L. foram orientadas nos frascos de cultivo somente em uma posição (com a extremidade basal voltada para cima e a extremidade apical em contato com o ágar) visando evitar possíveis erros ao trabalhar-se com cepas de *Agrobacterium* dependentes do suprimento endógeno de auxinas da planta, para as quais não haveria resposta positiva no caso de inoculação da bactéria na extremidade apical da estaca.

Nesta fase justifica-se a utilização de meio de cultura sem sais minerais e sem açúcares (somente ágar e água) porque a bactéria inoculada na extremidade da estaca pode eventualmente chegar ao meio de cultura sendo carregada pelos exsudatos liberados pela estaca ao ser cortada. Ao utilizarmos somente ágar e água como suporte a bactéria que eventualmente chegar até o meio não irá crescer ou causar a perda do material vegetal. Observações feitas por HASHIMOTO (1994, comunicação pessoal) trabalhando com estacas de tomate após a transformação por *Agrobacterium rhizogenes*, indicaram uma menor produção de raízes ao utilizar-se somente água e ágar quando comparada à utilização de meio contendo sais minerais. No caso de *Artemisia annua* L. não existem relatos quantificando a produção de raízes de acordo com o meio utilizado, então optou-se por manter a utilização de meio somente com água e ágar.

O aparecimento dos sintomas em resposta às inoculações pelo *Agrobacterium* nas estacas de *Artemisia annua* L. começou a ser observado a partir dos 14 dias após a inoculação. Na ocasião observou-se o aparecimento de raízes em uma pequena porcentagem das estacas inoculadas com o *Agrobacterium rhizogenes* cepa 8196. As estacas inoculadas com *Agrobacterium rhizogenes* cepa 15834 e com *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 não apresentaram resposta, apesar de ter sido observado, para as duas cepas, um pequeno inchaço na região inoculada das estacas. Nas observações aos 21 dias após a inoculação as cepas de *Agrobacterium rhizogenes* 8196 e *Agrobacterium tumefaciens* C58 apresentaram respostas positivas de produção de raízes e tumores, respectivamente, enquanto o *Agrobacterium rhizogenes* cepa 15834 não apresentou resposta de produção de raízes. Estas características de resposta permaneceram inalteradas aos 33 dias após a inoculação, quando foram feitas novas observações. Os dados obtidos estão demonstrados na tabela 7 e nas figuras 8 e 9.

Tabela 7. Respostas observadas nas estacas de *Artemisia annua* L. aos 14, 21 e 33 dias após inoculação da extremidade basal por *Agrobacterium rhizogenes* e *Agrobacterium tumefaciens*.

bactéria	dias após inoculação		
	14 dias	21 dias	33 dias
<i>A. rhizogenes</i> cepa 15834	sem resposta de produção de raízes	sem resposta de produção de raízes	sem resposta de produção de raízes
<i>A. rhizogenes</i> cepa 8196	raízes em 20% das estacas inoculadas	raízes em 50% das estacas inoculadas	raízes em 80% das estacas inoculadas
<i>A. tumefaciens</i> cepa C58	sem resposta de produção de tumores	tumores em 70% das estacas inoculadas	tumores em 70% das estacas inoculadas

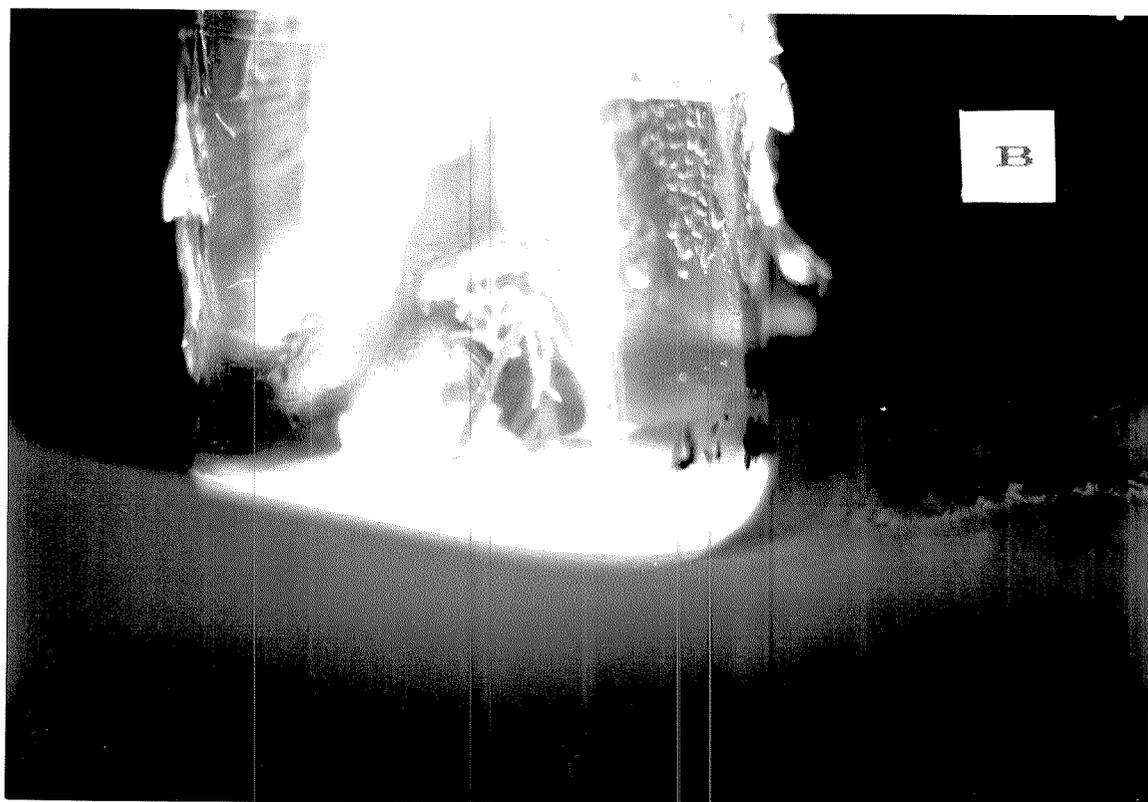
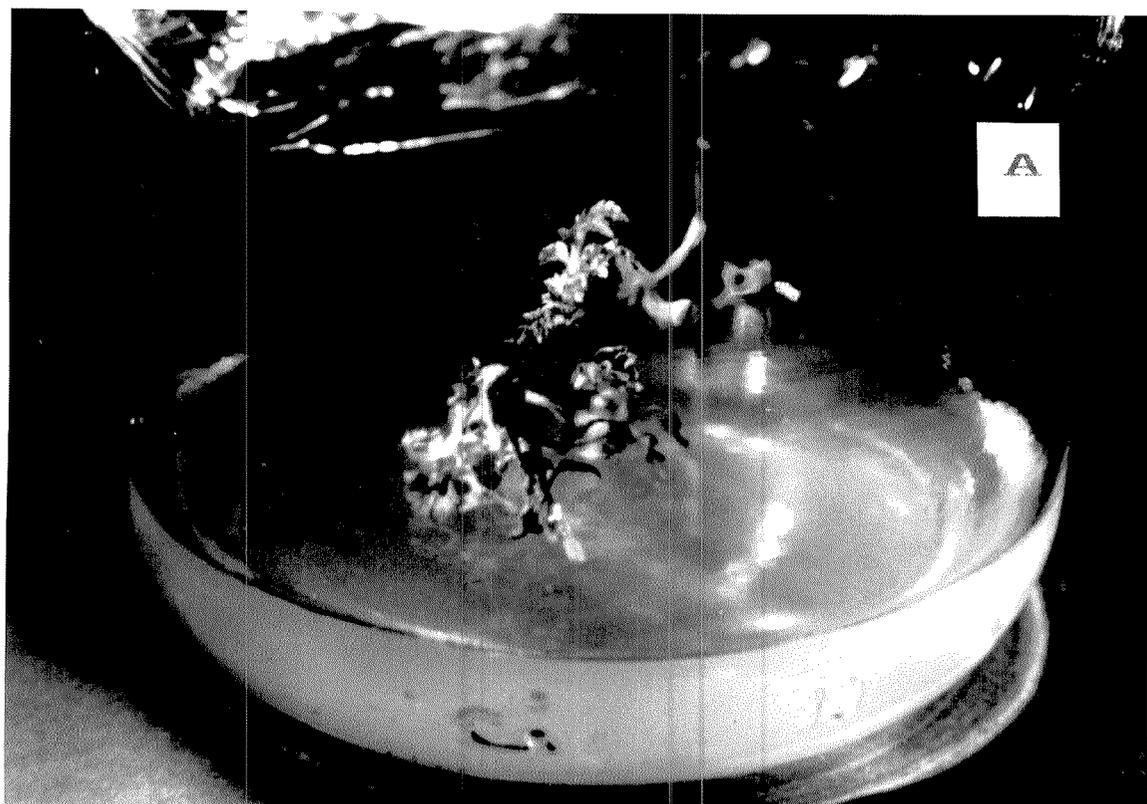


Figura 8. Respostas de produção de raízes em estacas de *Artemisia annua* L. inoculadas na extremidade basal por *Agrobacterium rhizogenes* cepa 8196. A. 21 dias após a inoculação. B. Aos 33 dias após a inoculação.

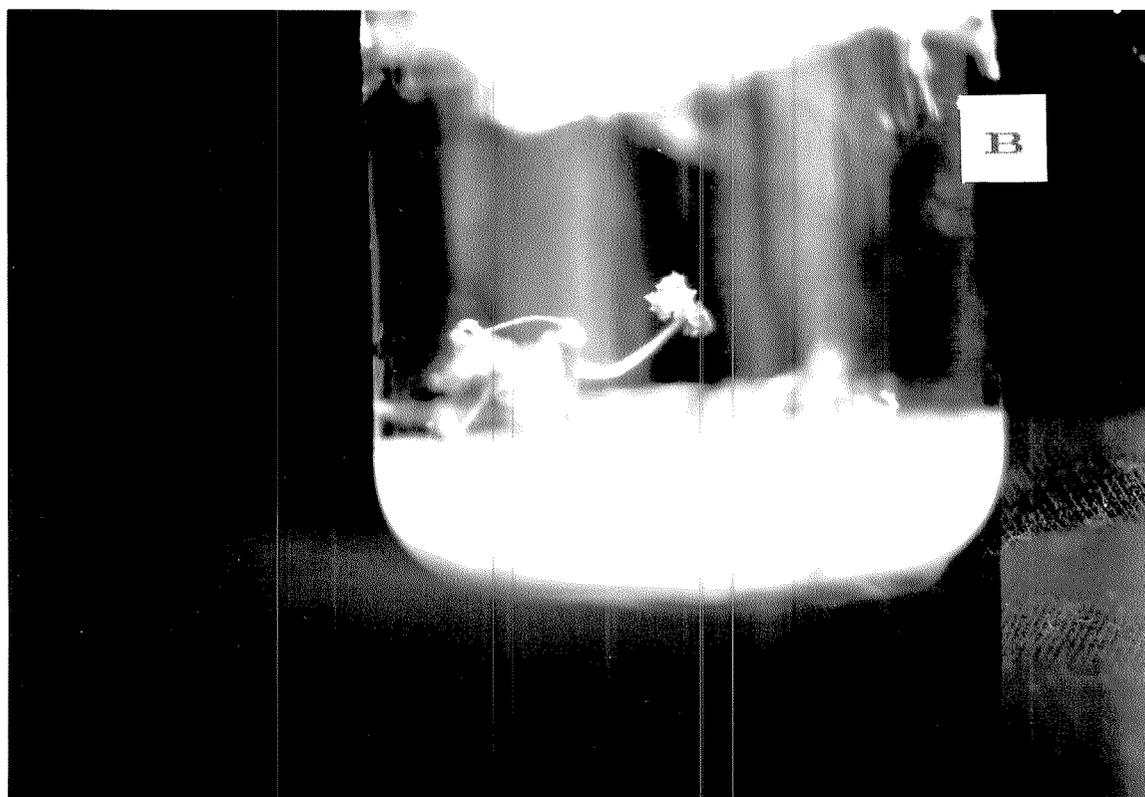
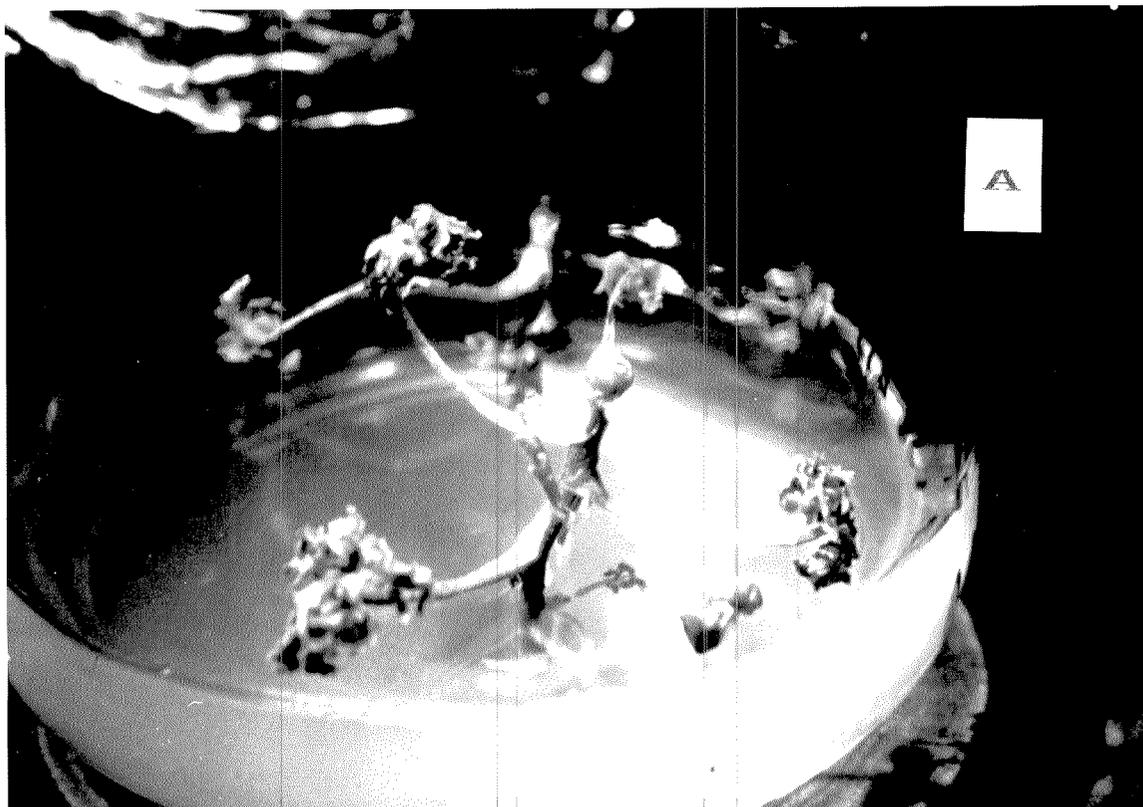


Figura 9. Respostas de produção de tumores em estacas de *Artemisia annua* L. inoculadas na extremidade basal por *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58. A. Aos 21 dias após a inoculação. B. Aos 33 dias após a inoculação.

A cepa de *Agrobacterium rhizogenes* 15834, apesar de ser mais virulenta com relação à cepa 8196 não apresentou resposta de produção de raízes após a inoculação. No entanto, nas três observações (14, 21 e 33 dias) verificou-se o aparecimento de um pequeno inchaço na região inoculada das estacas. Sabemos que o processo de transformação é bastante complexo e envolve várias etapas desde o reconhecimento pelo *Agrobacterium* das células feridas até a integração e a expressão do T-DNA no genoma da planta hospedeira, causando o aparecimento dos sintomas. Levanta-se então a hipótese de que a transformação das estacas de *Artemisia annua* L. inoculadas com o *Agrobacterium rhizogenes* cepa 15834 tenha ocorrido, porém alguma eventual alteração relacionada à produção de fitohormônios não tenha permitido a manifestação dos sintomas ou a produção de raízes.

Decorridos 40 dias da inoculação observou-se um início de oxidação nas estacas que não apresentaram resposta positiva e alguns dias depois estas começaram a secar e morrer, ao contrário das que tiveram resposta de produção de raízes ou tumores, que permaneciam verdes. Como o material controle, mantido sem sais para crescimento (somente em ágar e água) apresentou comportamento semelhante ao das estacas que não produziram sintomas, optou-se pelo descarte do material.

5.1.4. Isolamento das raízes transformadas obtidas da planta medicinal *Artemisia annua* L.

Para o isolamento das raízes transformadas das estacas de *Artemisia annua* L. padronizou-se que a raiz a ser isolada deveria ter cerca de 1 cm de comprimento, para tornar mais fácil a manipulação pois observou-se que as raízes menores apresentam uma maior tendência a romperem-se durante o isolamento. Ainda assim, optou-se por deixar as raízes crescerem o máximo possível nas estacas para então isolá-las, tomando somente o cuidado de que não chegassem a atingir o meio de

cultura do frasco para que não houvesse contaminação do meio com o *Agrobacterium*.

Os testes com duas concentrações de antibiótico tinham como objetivo otimizar o meio de isolamento para que fosse utilizada a menor quantidade de antibiótico possível, desde que a concentração determinada fosse eficiente com relação à eliminação da bactéria das raízes. Optou-se por utilizar o meio de sais minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962) com a concentração de macronutrientes reduzida à metade, bem como testar as concentrações de 100 e 250 µg/ml de meio para o antibiótico, conforme o protocolo utilizado no Laboratório de Biologia Celular de Plantas do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

As raízes isoladas nas placas tiveram seu comprimento inicial delimitado no fundo da placa, de modo que fosse possível saber posteriormente se houve ou não crescimento e fazer a distinção necessária entre as partes original e crescida da raiz. Essa distinção torna-se necessária pois o antibiótico contido no meio de cultura não apresenta a capacidade de matar as bactérias, apenas impede a sua multiplicação através da inibição da síntese de parede celular. Assim, as repicagens posteriores das raízes devem sempre ser feitas descartando-se a parte original e transferindo somente a parte crescida que deve apresentar uma menor quantidade (ou estar livre) de bactérias. Após algumas repicagens sucessivas pode-se eliminar o antibiótico do meio passando então ao cultivo propriamente dito.

Durante os testes para verificar a concentração ideal de antibiótico observou-se que a porcentagem de raízes que apresentaram crescimento foi maior ao utilizar-se cefotaxime na concentração de 100 µg/ml, no isolamento e na primeira repicagem. Por ocasião da segunda repicagem padronizou-se, então, a utilização da concentração de 100 µg/ml para todas as raízes obtidas nos testes para determinação da concentração ideal do antibiótico, passando a ser adotada esta concentração em todos os outros experimentos executados já a partir do isolamento das

raízes da estaca. Os dados relativos à porcentagem de raízes crescidas nos primeiros testes encontra-se especificada na tabela 8.

Tabela 8. Relação entre a concentração de antibiótico utilizada e a porcentagem de crescimento em raízes transformadas de *Artemisia annua* L. após o isolamento.

concentração do antibiótico	% de raízes crescidas	
	<i>isolamento</i>	<i>1ª repicagem</i>
100 µg/ml	90%	80%
250 µg/ml	70%	20%

Os tumores surgidos nas estacas de *Artemisia annua* inoculadas com o *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 não foram isolados durante o desenvolvimento deste trabalho por não estarem relacionados ao contexto do objetivo central do trabalho. A inoculação das estacas, juntamente com a posterior observação dos sintomas foi executada apenas em caráter ilustrativo do processo.

5.1.5. Cultivo das raízes após a transformação

Uma vez livres de qualquer contaminação pelo *Agrobacterium rhizogenes* as raízes transformadas de *Artemisia annua* L. foram transferidas para meio de cultura sólido, sem adição de antibiótico. Cada raiz transformada foi subcultivada através de várias passagens pelo meio sólido antes de serem

transferidas para o cultivo em meio líquido, de acordo com procedimento descrito por WEATHERS *et al.* (1994). Optou-se inicialmente por manter o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento e subcultivos das raízes, apenas eliminando-se o antibiótico, sendo esse o meio de sais minerais de MURASHIGE & SKOOG (1962), com a concentração de macronutrientes reduzida à metade (MS½).

Após dois subcultivos em meio MS½ sem antibiótico testou-se uma redução na concentração iônica do meio e seus possíveis efeitos sobre o crescimento. Na ocasião escolheu-se o meio de sais minerais de WHITE (1943), de concentrações reduzidas se comparado ao meio MS e amplamente utilizado para culturas em suspensão em geral. O meio de WHITE foi modificado, no entanto, mantendo-se o FeEDTA do meio anterior. Observou-se, então, que a resposta das raízes com relação ao crescimento foi significativamente melhor no cultivo em meio de concentração reduzida (meio de WHITE), sendo que neste meio as raízes passaram a crescer em uma velocidade cerca de duas vezes maior que as raízes cultivadas no meio MS½. Estas mesmas observações já haviam sido relatadas anteriormente por HAMILL *et al.* (1987), em trabalhos com raízes transformadas de *Datura stramonium*.

De acordo com os resultados observados durante o cultivo em meio sólido das raízes transformadas de *Artemisia annua* L., estas foram transferidas para meio de cultura líquido, optando-se pela utilização do meio de sais minerais de WHITE (1943), onde as raízes apresentaram maior velocidade de crescimento no cultivo em meio sólido. No caso do cultivo em meio WHITE líquido, as observações sobre o crescimento mostraram que as raízes cresciam ainda mais rapidamente quando comparadas ao cultivo em meio WHITE sólido, sendo que para este experimento, as raízes transformadas cultivadas em meio WHITE líquido aproximadamente dobravam sua biomassa em 4-5 dias de cultivo. Diante de tais resultados, podemos confirmar a validade do processo de transformação que, independentemente de um aumento

nos teores de metabólitos produzidos, já torna-se bastante atrativo devido à velocidade de crescimento das culturas que leva a um considerável aumento da biomassa em períodos de tempo bastante curtos.

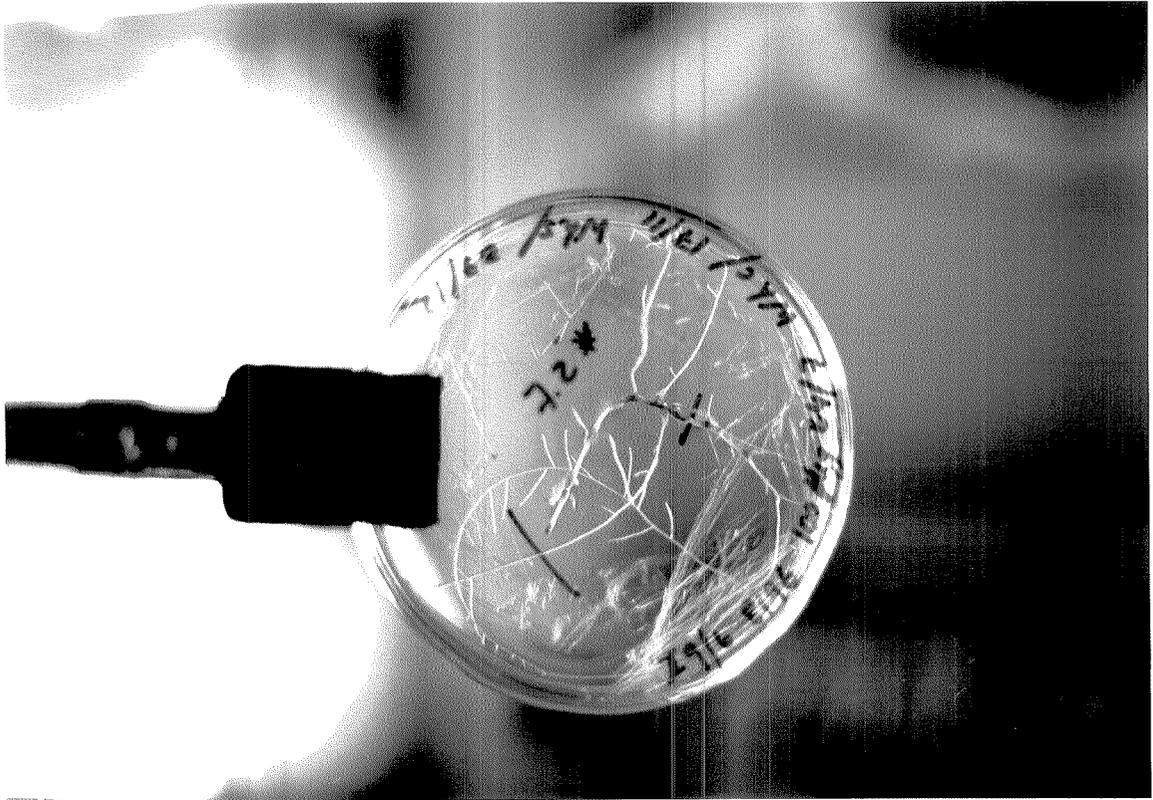


Figura 10. Raízes transformadas de *Artemisia annua* L. cultivadas em meio sólido.

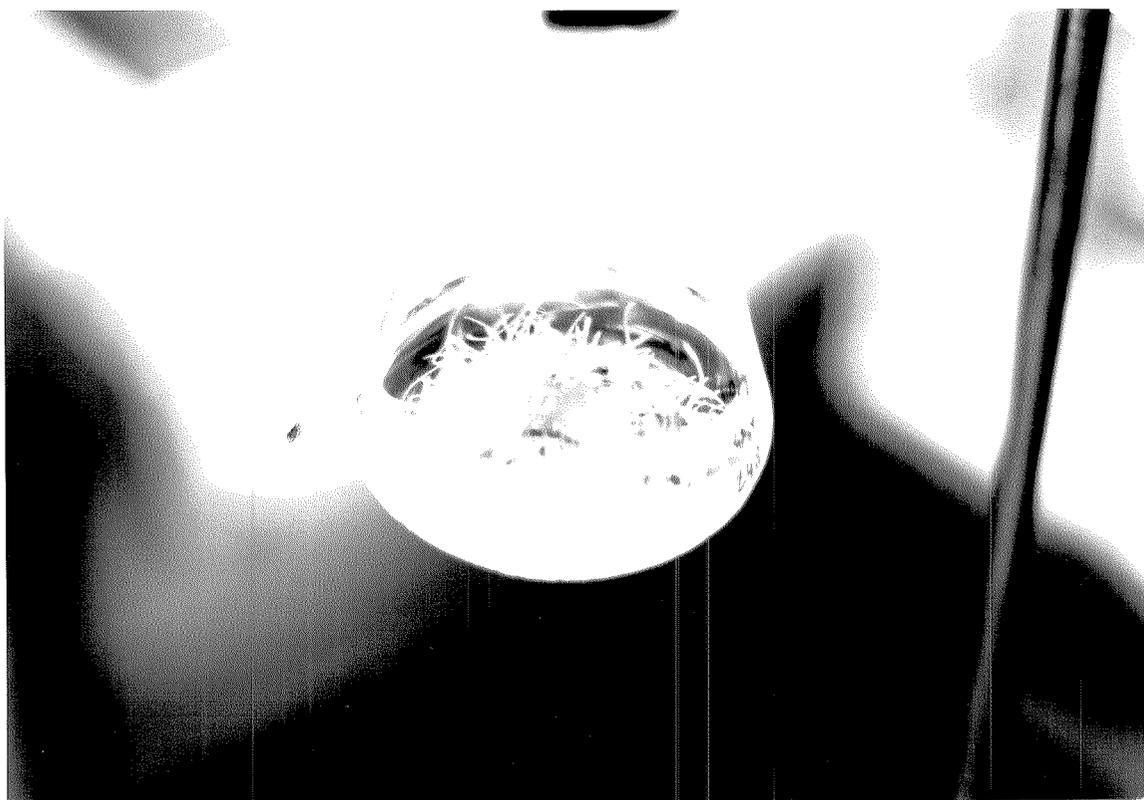


Figura 11. Raizes transformadas de *Artemisia annua* L. cultivadas em meio líquido.

5.2. Análises químicas

Existem na literatura relatos de diversos métodos para análise de artemisinina. A cromatografia de camada delgada (CCD) já foi utilizada anteriormente para artemisinina e citada por KLAYMAN *et al.* (1984), ROTH & ACTON (1989), PRAS *et al.* (1991) e DELABAYS *et al.* (1992), tendo sido testados diversos solventes para extração a partir de material vegetal seco com obtenção de teores entre 0,06 a 0,1%. Há outros métodos relatados na literatura, como a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) com redução eletroquímica utilizada por ACTON *et al.* (1985), necessitando de precauções especiais relacionadas à redução do oxigênio molecular. EL-SOHLY *et al.* (1990) relataram detecção HPLC/UV após hidrólise de artemisinina com derivatização em pós-coluna, método trabalhoso e que implica em diluições na amostra. PRAS *et al.* (1991) descreve métodos por radioimunoensaio e polarografia, enquanto WOERDENBAG *et al.* (1991) relata a utilização de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (CG/MS).

Neste trabalho optou-se por realizar as análises químicas por CCD pois os outros métodos citados, apesar de mais sensíveis e específicos ainda não são apropriados à utilização em condições de rotina, onde a CCD apresenta múltiplas vantagens, como facilidade de execução em curto espaço de tempo, boa reprodutibilidade e baixo custo. Comparações feitas por PRAS *et al.* (1991) para métodos por CCD e HPLC apresentaram estreita correlação entre os resultados, sendo essa metodologia por CCD modificada por FIGUEIRA (1995) para que pudessem ser analisados também os teores de ácido artemisinínico e artenuína B. O método modificado e descrito por FIGUEIRA (1995) foi utilizado para as análises neste trabalho. Segundo DELABAYS (1994, comunicação pessoal) o limite de detecção de artemisinina pelo método utilizado se situa em torno de 30 ng do composto.

Como já foi citado anteriormente na literatura, raízes normais de *Artemisia annua* L. não possuem a capacidade de

acumular artemisinina (PRAS *et al.*, 1991), sendo que este composto é encontrado nas partes aéreas da planta, principalmente nas folhas. Assim sendo, nossas atenções concentraram-se principalmente sobre os precursores (ácido artemisinínico e artenuína B), devido à maior probabilidade de produção desses compostos no material transformado, aliada ao grande interesse nesses precursores em função das suas aplicações para síntese indireta de artemisinina.

Durante este trabalho, foram realizadas análises por CCD em 20 extratos de amostras de raízes normais, sendo que em nenhuma delas foi detectada a presença de artemisinina. No entanto, em todos os extratos analisados detectou-se a presença dos precursores ácido artemisinínico (em concentrações variando entre 0,01 e 0,025% do peso seco da amostra) e artenuína B (em traços). Para as raízes transformadas, foram analisados 13 clones independentes, detectando-se a presença de ácido artemisinínico e de artenuína B, enquanto a artemisinina não foi detectada em nenhuma das amostras. Esses resultados concordam com dados da literatura que citam que os compostos sintetizados em cultura pelas raízes transformadas normalmente são os mesmos produzidos pelas raízes das plantas normais da mesma espécie (HAMILL *et al.*, 1986; KAMADA *et al.*, 1986), apesar de existirem relatos recentes de detecção de artemisinina em raízes transformadas de *Artemisia annua* L. (WEATHERS *et al.*, 1994; JAZIRI *et al.*, 1995) e de compostos não existentes em raízes normais em cultivo de raízes transformadas de *Artemisia absinthium* (KENNEDY *et al.*, 1993). Com relação às concentrações de ácido artemisinínico e artenuína B nas raízes transformadas, observou-se que o ácido foi detectado em quantidades relativamente mais altas que nas raízes normais, encontrando-se na faixa de 0,02 a 0,07% do peso seco da amostra (tabela 9). Já a artenuína B foi detectada apenas em traços, não sendo possível a sua quantificação. Levando-se em conta as altas taxas de crescimento das raízes transformadas em cultura, associadas a uma produção do ácido artemisinínico em quantidades

mais altas que as produzidas normalmente pelas raízes e a uma total ausência de graxas que dificultam a extração dos compostos quando se trabalha com plantas inteiras tornam as raízes transformadas uma excelente fonte para futuras investigações.

Durante a execução das análises do meio líquido de cultivo das raízes transformadas para verificação de uma possível liberação de compostos pelas raízes para o meio, observou-se total ausência de artenuína B, enquanto o ácido artemisinínico aparece no meio de cultura apenas em traços. No entanto, foi detectada a presença de um composto desconhecido, nunca antes detectado em nossas condições de rotina, para nenhum tipo de material analisado (onde inclui-se plantas inteiras vindas do campo, plantas inteiras cultivadas "in vitro", raízes, brotos sem raiz, calos e culturas de células em suspensão). Os resultados nos levam a crer que esse composto provavelmente seria produzido apenas pelas raízes transformadas em cultura, sendo então liberado para o meio de cultura. Experimentos vêm sendo conduzidos na tentativa de identificar esse composto, sua relação com os compostos anti-maláricos de interesse terapêutico e suas possíveis aplicações na área medicinal.

Tabela 9. Concentrações de ácido artemisinínico detectadas em raízes normais e transformadas.

AMOSTRA	ORIGEM	ÁC. ARTEM (% PS)	AMOSTRA	ORIGEM	ÁC. ARTEM. (% PS)
RT-01	Clone 3.1 (A)	0,036	RN-05	Planta 5	0,016
RT-02	Clone 3.5 (A)	0,070	RN-06	Planta 6	0,012
RT-03	Clone 3.5 (E)	0,044	RN-07	Planta 7	0,021
RT-04	Clone 1.6 (B)	0,020	RN-08	Planta 8	0,016
RT-05	Clone 3.5 (B)	0,060	RN-09	Planta 9	0,010
RT-06	Clone 3.1 (C)	0,038	RN-10	Planta 10	0,011
RT-07	Clone 7.2 (A)	0,036	RN-11	Planta 11	0,018
RT-08	Clone 1.4 (A)	0,051	RN-12	Planta 12	0,010
RT-09	Clone 7.2 (B)	0,043	RN-13	Planta 13	0,021
RT-10	Clone 1.4 (B)	0,043	RN-14	Planta 14	0,025
RT-11	Clone 3.1 (B)	0,057	RN-15	Planta 15	0,020
RT-12	Clone 1.4 (C)	0,061	RN-16	Planta 16	0,025
RT-13	Clone 3.5 (C)	0,055	RN-17	Planta 17	0,016
RN-01	Planta 1	0,013	RN-18	Planta 18	0,011
RN-02	Planta 2	0,010	RN-19	Planta 19	0,010
RN-03	Planta 3	0,022	RN-20	Planta 20	0,011
RN-04	Planta 4	0,020			

* As amostras RT referem-se à raízes transformadas e as amostras RN, à raízes normais. As raízes normais são provenientes de plantas cultivadas "in vitro", com 4 meses de idade, germinadas a partir do mesmo lote de sementes utilizado na obtenção de estacas para os experimentos de transformação.

5.3. Caracterização molecular das raízes de *Artemisia annua* L. transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* cepa 8196

Durante a execução das etapas anteriores deste trabalho tornou-se claro que a transformação das raízes de *Artemisia annua* L. obtidas após a inoculação com o *Agrobacterium rhizogenes* cepa 8196 havia ocorrido, devido às observações das características fenotípicas durante o cultivo do material obtido. O padrão de crescimento das raízes em cabeleira, a velocidade do crescimento, a ausência de geotropismo, que no conjunto caracterizam fenotipicamente a ocorrência da transformação não deixaram dúvidas de que tratavam-se de raízes transformadas. Porém, apesar de todas as evidências fenotípicas, foi imprescindível que se executasse uma caracterização dessas raízes a nível molecular, evidenciando definitivamente a passagem do material genético da bactéria para a planta.

Para esta caracterização molecular os três clones de raízes selecionados foram obtidos nos primeiros testes de transformação, ou seja, material já estabelecido em cultivo durante aproximadamente um ano, tempo suficiente para que raízes eventualmente não transformadas pudessem ser diferenciadas pelo padrão de crescimento com relação às raízes transformadas. Partindo-se de raízes em cultivo, apresentando pesos entre 0,62 e 2,60 g, e de 1 g de amostra de planta não transformada (controle negativo da transformação), foi feita a extração de acordo com a metodologia descrita por DELLAPORTA *et al.* (1983). A escolha da metodologia foi por esta ser especialmente adaptada para pequenas quantidades de material vegetal ("miniprep"). Após a extração do DNA das amostras foi verificada a concentração obtida através de uma eletroforese em gel de agarose utilizando-se concentrações conhecidas de DNA de bacteriófago λ (variando entre 100 e 1000 ng/ μ l) como padrão. O resultado obtido após exposição à luz UV pode ser observado na figura 12. As concentrações de DNA estimadas por comparação com os padrões de concentração foram de

100 ng/ μ l para as três amostras de raízes transformadas e de 70 ng/ μ l para a amostra de planta não transformada. A figura 12 mostra ainda que a metodologia utilizada para a extração foi eficiente para *Artemisia annua* L. podendo-se observar que o DNA extraído apresentou-se bastante puro e íntegro.

Após a extração, inicialmente foi escolhido o processo de "Dot Blot" para a caracterização molecular. Este processo de hibridização compreende basicamente a aplicação de séries de amostras de DNA em quantidades iguais, próximas umas das outras e em manchas de diâmetro uniforme sobre uma membrana de nylon ou nitrocelulose. O DNA é desnaturado e submetido à incubação em uma solução contendo as sequências correspondentes com marcações radioativas específicas (32 P), ao qual denominamos sonda e que será hibridizado com o material a ser testado, sendo depois exposto a um filme de raio-X (KAFATOS *et al.*, 1979). A extensão da hibridização para cada mancha de DNA é avaliada semi-quantitativamente após a impressão do filme, por comparação visual da intensidade e do diâmetro aparente das manchas com um padrão. Devido ao tamanho grande e variável das manchas aplicadas não é possível obter-se medidas quantitativas precisas, porém em muitos casos consegue-se ter uma boa idéia da expressão de um determinado gene por comparação relativa (THOMAS, 1983; SAMBROOK *et al.*, 1989). A técnica do "Dot Blot" é especialmente conveniente quando apenas estimativas semi-quantitativas são necessárias, fornecendo um método rápido e eficiente de "screening". Outra vantagem é que o método necessita de quantidades relativamente pequenas de tecido e implica em pouca manipulação de cada amostra (KAFATOS *et al.*, 1979; WHITE & BANCROFT, 1982; THOMAS, 1983) não sendo necessário, por exemplo, digerir o DNA por enzimas de restrição.

A membrana para o "Dot Blot" foi preparada aplicando-se amostras de 500 ng de DNA genômico das raízes transformadas e da planta não transformada, e 500 ng do DNA de bacteriófago λ . Como controle positivo foram aplicados 2 ng do fragmento número 6, de 7,2 kb, purificado da digestão do

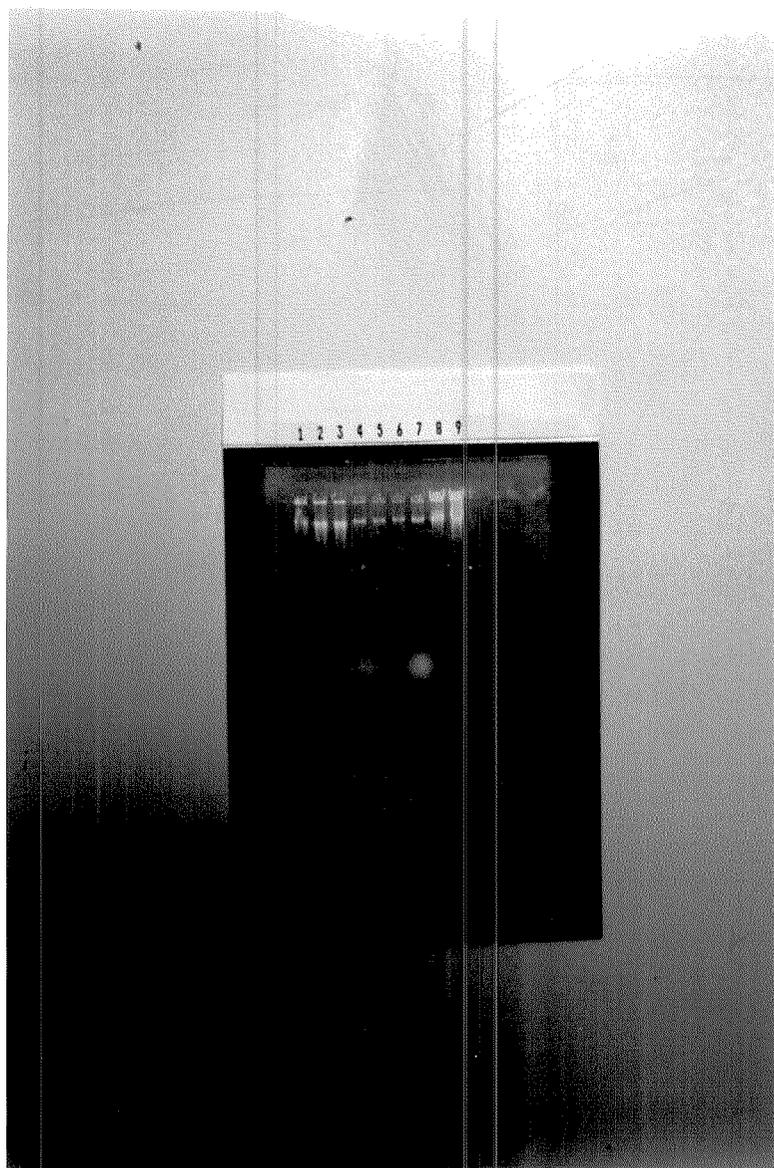


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose para determinação da concentração obtida após extração do DNA das amostras de raízes transformadas e de planta não transformada de *Artemisia annua* L. As linhas 1, 2, 3, 8 e 9 representam DNA de bacteriófago λ nas concentrações de 100, 200, 300, 500 e 1000 ng/ μ l. As linhas 4, 5 e 6 referem-se a DNA de raízes transformadas e a linha 7 corresponde ao DNA de planta não transformada.

plasmídeo p6 (subclone do pRi8196) pela endonuclease de restrição *Bam*HI. Esse mesmo fragmento foi posteriormente utilizado como sonda radioativa durante a hibridização da membrana. Na figura 13 é mostrado o padrão da digestão *Bam*HI na região do T-DNA do plasmídeo, estando identificado o fragmento 6 utilizado como controle positivo e como sonda marcada com o (α - 32 P)dCTP.

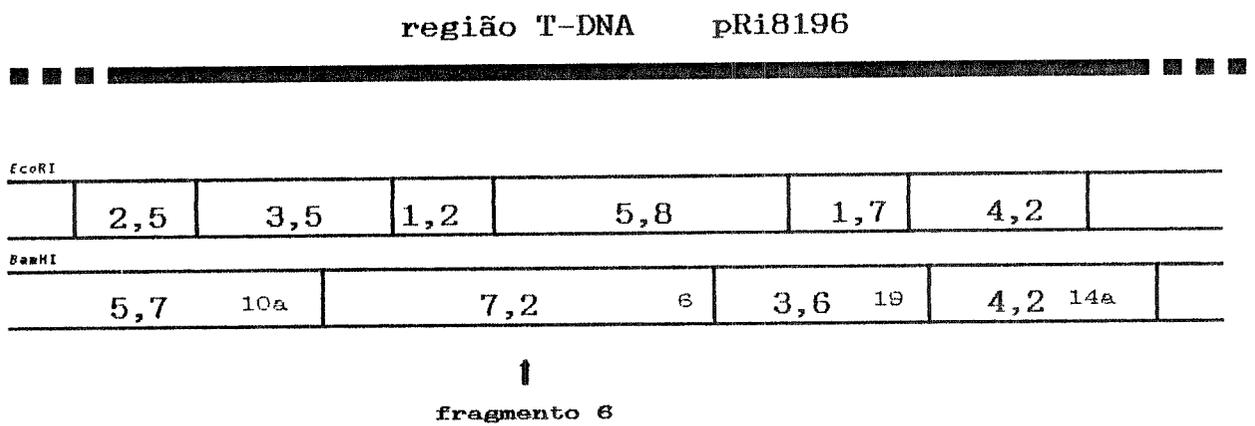


Figura 13 - Padrão de digestão do pRi8196 na região do T-DNA para as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI* (mostrando a região do fragmento 6, de 7,2 kb, da digestão *BamHI*, utilizado como sonda neste trabalho). (Extraído de TEMPÉ & CASSE-DELBART, 1989).

O fragmento 6 utilizado como sonda foi obtido do pRi8196, o mesmo utilizado para a transformação da *Artemisia annua* L. neste experimento. Como a transformação caracteriza-se pela passagem e integração do T-DNA da bactéria para o genoma da planta, após a hibridização esperava-se um sinal positivo nas amostras de DNA das raízes, que seria resultante da ligação dos nucleotídeos marcados da sonda aos fragmentos do T-DNA existentes nas raízes transformadas. Por outro lado, os controles negativos não deveriam hibridizar-se com a sonda, não apresentando assim nenhum sinal impresso no filme de raio-X. Conforme o esperado, as amostras de raízes apresentaram o sinal positivo que caracteriza a transformação. No entanto, após a hibridização os controles negativos (DNA de planta não transformada e de bacteriófago λ) também apresentaram um sinal impresso no filme de raio-X (figura 14). Como as amostras utilizadas no controle negativo não contém o T-DNA da bactéria, esse pequeno sinal indica que talvez possa existir uma pequena contaminação no fragmento utilizado como sonda, que então hibridizou-se com outras sequências existentes nos controles negativos que não seriam fragmentos do T-DNA.

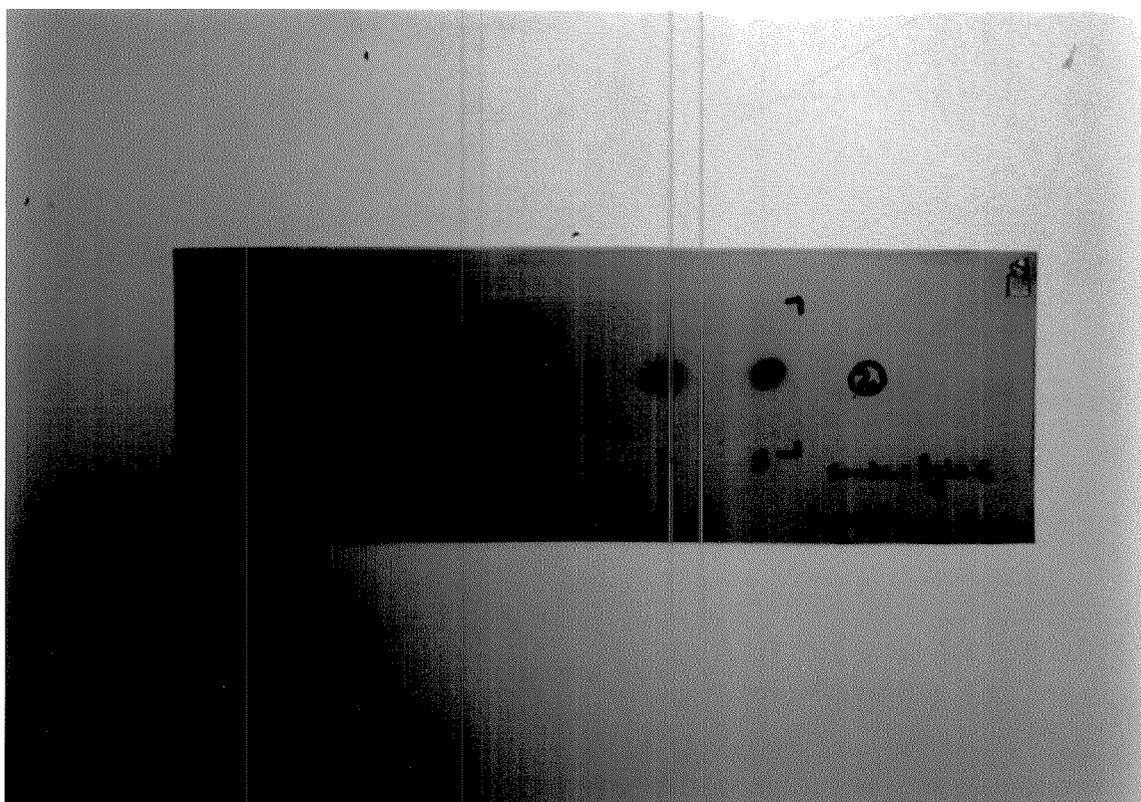


Figura 14. Autoradiografia da membrana do "Dot Blot" após exposição de 6 dias. As amostras 1,3 e 7 referem-se às raízes transformadas. A amostra PI corresponde à planta não transformada e λ ao DNA do bacteriófago (controles negativos). A amostra S corresponde ao fragmento 6 da digestão *Bam*HI do plasmídeo p6, utilizado como sonda.

Passou-se, então, à caracterização molecular do material por "Southern Blot". Esse processo, apesar de ser mais trabalhoso que o "Dot Blot" e de necessitar de maior quantidade e maior manipulação do material, permite uma visualização mais detalhada com relação à presença e estrutura dos genes envolvidos. O DNA a ser estudado é digerido com uma ou mais endonucleases de restrição, sendo cortado de maneira específica de acordo com a enzima utilizada. Os fragmentos resultantes da digestão são separados por tamanho com uma eletroforese em gel de agarose, desnaturados e transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose por um sistema que caracteriza a transferência por "Southern Blotting" (SOUTHERN, 1975; DARBRE, 1988). Após a transferência, a membrana é incubada em uma solução contendo as sequências correspondentes aos fragmentos transferidos marcadas radioativamente, denominados sonda, que irão hibridizar-se com o DNA na membrana. Expondo-se a membrana a um filme de raio-X como no processo de "Dot Blot" o filme, após revelado, irá mostrar a posição de cada fragmento de DNA que sofreu hibridização com a sonda utilizada.

Para que se pudesse fazer a separação das bandas por eletroforese o DNA foi digerido por uma endonuclease de restrição, utilizando-se 10 µg de DNA genômico de cada amostra das raízes e da planta não transformada para as digestões. De acordo com o padrão de digestão na região do T-DNA do pRi8196 para diferentes enzimas (figura 13), e levando-se em conta a utilização do fragmento 6 da digestão *Bam*HI como sonda, optou-se pela utilização da enzima *Eco*RI. Como controle positivo foram aplicadas diretamente no gel da eletroforese duas amostras de 100 pg cada, dos fragmentos 6 e 14 da digestão *Bam*HI do pRi8196. Como controle negativo foi utilizado DNA de bacteriófago λ previamente digerido pela enzima *Hind*III. O DNA digerido foi então separado por eletroforese em gel de agarose e transferido para membrana que foi hibridizada com a sonda e exposta ao filme de raio-X. A figura 15 mostra a posição dos fragmentos obtidos após a hibridização com a sonda, confirmando a integração do T-DNA nas

raízes e evidenciando a transformação, ao contrário dos controles negativos, onde não são verificados os fragmentos encontrados nas raízes transformadas.

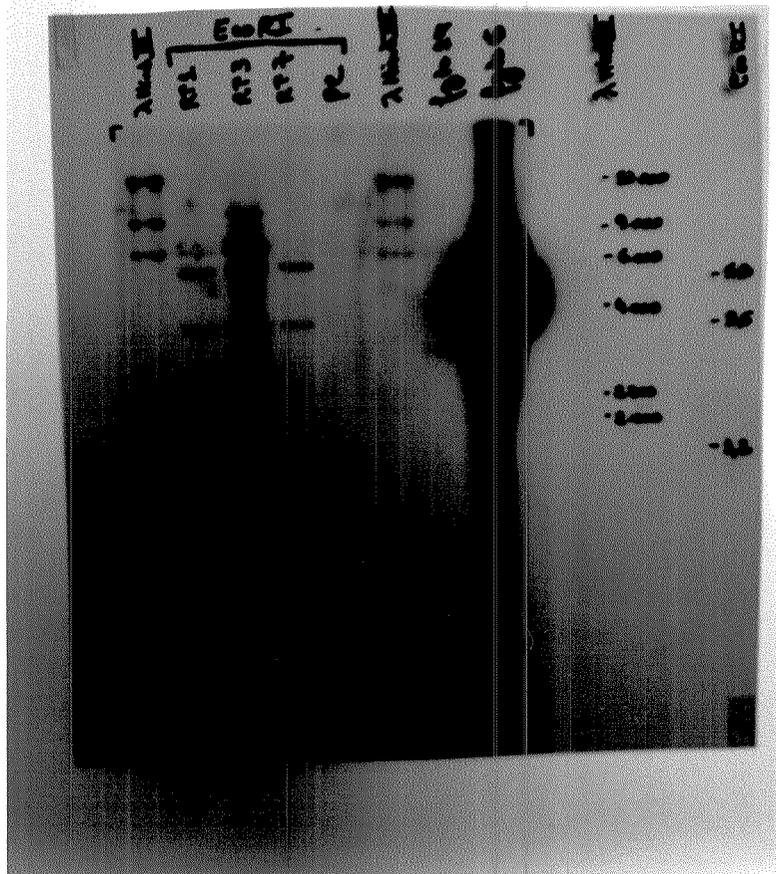


Figura 15. Autoradiografia da membrana do "Southern Blot" após hibridização com o fragmento 6 (7,2 kb) purificado da digestão *Bam*HI do pRi8196. As linhas 5, 6 e 7 referem-se à DNA de raízes e a linha 4 de planta não transformada após digestão *Eco*RI; as linhas 1 e 2 referem-se, respectivamente, aos fragmentos 6 e 14 purificados da digestão *Bam*HI do pRi8196; as linhas 3 e 8 referem-se ao DNA de bacteriófago λ digerido por *Hind*III.

6. CONCLUSÕES

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho pudemos verificar que a utilização da técnica de raízes transformadas apresenta-se bastante válida para as espécies medicinais. No caso específico do protocolo proposto para *Artemisia annua* L., observamos que as raízes transformadas mantiveram a produção de compostos medicinais conforme o padrão normal da planta, sendo considerável o aumento observado na velocidade de crescimento dos tecidos. Além da possibilidade de obtenção de quantidades significativamente maiores de biomassa em curto espaço de tempo, a produção de compostos pelas raízes transformadas também apresenta vantagens devido a uma ausência de graxas, que são encontradas normalmente em plantas inteiras e dificultam o processo de extração.

O ácido artemisinínico produzido pelas raízes transformadas de *Artemisia annua* L. é um composto de interesse que pode ser transformado em artemisinina ou outros compostos correlatos. Sendo que a produção do composto pelas raízes transformadas apresentou-se maior que em raízes normais, as raízes transformadas poderão ser cultivadas em maior escala utilizando-se fermentadores ou bioreatores. Futuramente, além do cultivo das raízes transformadas poderão ser desenvolvidos cultivos com extração diretamente do meio sem a necessidade de retirada do material vegetal. Outro enfoque futuro para a transformação em *Artemisia annua* L. seria um trabalho com raízes modificadas geneticamente, incluindo ou não genes específicos para determinadas funções não executadas normalmente pela planta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, N.; KLAYMAN, D.L.; ROLLMAN, I.J. 1985. Reductive electrochemical HPLC assay for artemisinin (qinghaosu). *Planta Med.* 51: 445-446.
- ADEODATO, S.; MASCARENHAS, M.G. 1995. A invasão dos mosquitos. *Globo Ciência* 43: 68-73.
- AKHILA, A.; THAKUR, R.S.; POPLI, S.P. 1987. Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 26: 1927-1930.
- AKHILA, A.; RANI, K.; THAKUR, R.S. 1990. Biosynthesis of artemisinic acid in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 29: 2129-2132.
- ANÔNIMO. 1992. Rediscovering wormwood: qinghaosu for malaria (editorial). *Lancet* 339: 649-651.
- AVERY, M.A.; JENNINGS-WHITE, C.; CHONG, W.K.M. 1987. The total synthesis of (+)-artemisinin and (+)-9-desmethylartemisinin. *Tetrahedron Lett.* 28: 4629-4632.
- AVERY, M.A.; CHONG, W.K.M.; JENNINGS-WHITE, C. 1992. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 974-979.

- BERCETCHE, J.; CHRIFI, D.; ADAM, S.; DAVID, C. 1987. Morphogenetic and cellular reorientations induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strains 1855, 2659 and 8196) on carrot, pea and tobacco. *Plant Sci.* 52: 195-210.
- BINNS, A.N. 1990. *Agrobacterium*-mediated gene delivery and the biology of host range limitations. *Physiol. Plant.* 79: 135-139.
- BIROT, A.M.; BOUCHEZ, D.; CASSE-DELBART, F.; DURAND-TARDIF, M.; JOUANIN, L.; PAUTOT, V.; ROBAGLIA, C.; TEPFER, D.; TEPFER, M.; TORNEUR, J.; VILAINE, F. 1987. Studies and uses of the Ri plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 323-335.
- BOULOS, M. 1995. Vacinas do século 21. O Estado de São Paulo, 2/7/1995, pg. D4-D6.
- BOULTON, M.I.; BUCHHOLZ, W.G.; MARKS, M.S.; PARKHAM, P.G.; DAVIES, J.W. 1989. Specificity of *Agrobacterium* mediated delivery of maize streak virus DNA to members of the Gramineae. *Plant Mol. Biol.* 12: 31-40.
- BROWN, G.D. 1993. Production of anti-malarial and anti-migraine drugs in tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Acta Hort.* 330: 269-276.
- BROWN, G.D. 1994. Secondary metabolism in tissue culture of *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 57: 975-977.
- CARDARELLI, M.; SPANO, L.; DE PAOLIS, A.; MAURO, M.L.; NITALI, G.; COSTANTINO, P. 1985. Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol. Biol.* 5: 385-391.

- CARDARELLI, M.; SPANO, L.; MARIOTTI, D.; MAURO, M.L.; VAN SLUYS, M.A.; COSTANTINO, P. 1987. The role of auxin in hairy root induction. *Mol. Gen. Genet.* 208: 457-463.
- CARVALHEIRO, J.R. 1995. Vacinas do século 21. *O Estado de São Paulo*, 2/7/1995, pg. D4-D6.
- CHERFAS, J. 1990. Malaria vaccines: the failed promise. *Science* 247: 402-403.
- CHILTON, M.D.; TEPFER, D.A.; PETIT, A.; DAVID, C.; CASSE-DELBART, F.; TEMPÉ, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434.
- CHIUNG-SHEUE, C.L.K.; YANG, S.L.; ROBERTS, M.F.; ELFORD, B.C.; PHILLIPSON, J.D. 1992. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Rep.* 11: 637-640.
- COMBARD, A.; BREVET, J.; BOROWSKI, D.; CAM, K.; TEMPÉ, J. 1987. Physical map of the T-DNA region of *Agrobacterium rhizogenes* NCPPB2659. *Plasmid* 18: 70-75.
- DARBRE, P.D. 1988. Introduction to practical molecular biology. Ed. Wiley, 117 pg.
- DAVID, C.; CHILTON, M.D.; TEMPÉ, J. 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Bio/Technology* 2: 73-76.
- DAVID, C.; TEMPÉ, J. 1988. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 7: 88-91.

- DE PAOLIS, A.; MAURO, M.L.; POMPONI, M.; CARDARELLI, M.; SPANO, L.; COSTANTINO, P. 1985. Localization of agropine-synthesizing functions in the T_R region of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plasmid* 13: 1-7.
- DELABAYS, N.; BLANC, C.; COLLET, G. 1992. La culture et la sélection d'*Artemisia annua* L. en vue de la production d'artémisinine. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hort.* 24: 245-251.
- DELABAYS, N.; BENAKIS, A.; COLLET, G. 1993. Selection and breeding for high artemisinin (Qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua* L. *Acta Hort.* 330: 203-207.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version 2. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1: 19-22.
- DUTTA, G.P.; BAJPAI, R.; VISHWAKARMA, R.A. 1989. Antimalarial efficacy of arteether against multiple drug resistant strain of *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Pharmacol. Res.* 21: 415-419.
- EL-FERALY, F.S.; AL-MESHAL, I.A.; AL-YAHYA, M.A.; HIFNAWY, M.S. 1986. On the possible role of qinghao acid in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry* 25: 2777-2778.
- EL-SOHLY, H.N. 1990. A large scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 53: 1560-1564.

- ENDO, T.; YAMADA, Y. 1985. Alkaloid production in cultured roots of three species of *Duboisia*. *Phytochemistry* 24: 1233-1236.
- ENDRESS, R. (ed.). 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 353p.
- FERREIRA, J.F.S. 1994. Production and detection of artemisinin in *Artemisia annua* L. Tese de Doutorado, Purdue University, EUA, 125p.
- FIGUEIRA, G.M. 1995. Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua* L. Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 74p.
- GORDON, M.P. 1981. Tumor formation in plants. In *The Biochemistry of Plants*, vol.6, pg. 531-570. Academic Press, Inc.
- GRAVES, A.C.F.; GOLDMAN, S.L. 1986. The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 7: 43-50.
- GRIMSLEY, N.; HOHN, T.; DAVIES, J. W.; HOHN, B. 1987. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* 325: 177-179.
- HAMILL, J.D.; PARR, A.J.; ROBINS, R.J.; RHODES, M.J.C. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiniana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 5: 111-114.

- HAMILL, J.D.; PARR, A.J.; RHODES, M.J.C.; ROBINS, R.J.; WALTON, N.J. 1987. New routes to plant secondary products. *Bio/Technology* 5: 800-804.
- HASHIMOTO, T.; YIKIMUNE, Y.; YAMADA, Y. 1986. Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *J.Plant Physiol.* 124:61-75.
- HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPERDORT, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38.
- HOOYKAAS-VAN SLOGTEREN G.M.S.; HOOYKAAS, P.J.J.; SCHILPERDORT, R. A. 1984. Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 311: 763-764.
- HUNTER, C.S.; NEILL, S.J. 1990. Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* and growth of hairy roots in vitro. In *Methods in Molecular Biology*, vol.6, pg. 279-288. Ed. Pollard & Walker, The Human Press.
- INZE, D.; FOLLIN, A.; VAN LIJSEBETTENS, M.; SIMOENS, C.; GENETELLO, C.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 194: 265-274.
- JAZIRI, M.; DIALLO, B.; VANHAELEN, M.; HOMES, J.; YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. 1993. Immunodetection of artemisinin in *Artemisia annua* cultivated in hydroponic conditions. *Phytochemistry* 33: 821-826.

- JAZIRI, M.; SHIMOMURA, K.; YOSHIMATSU, K.; FAUCONNIER, M.-L.; MARLIER, M.; HOMES, J. 1995. Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. *J. Plant Physiol.* 145: 175-177.
- JONES, M.G.K.; LINDSEY, K. 1988. Plant biotechnology. In *Molecular Biology & Biotechnology*. pg. 117-147. Ed. J.M.Walker/E.B.Gingold.
- JOUANIN, L. 1984. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. *Plasmid* 12: 91-102.
- JUNG, M.; ELSOHLY, H.N.; McCHESNEY, J.D. 1990. Artemisinic acid: a versatile chiral synthon and bioprecursor to natural products (poster). *Planta Med.* 56: 624.
- KAFATOS, F.C.; JONES, C.W.; EFSTRATIADIS, A. 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.* 7: 1541.
- KAMADA, H.; OKAMURA, N.; SATAKE, M.; HARADA, H.; SHIMOMURA, K. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* 5: 239-242.
- KENNEDY, A.I.; DEANS, S.G.; SVOBODA, K.P.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. 1993. Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*. *Phytochemistry* 32: 1449-1451.
- KEVILLE, K. 1994. The herbs. In *Herbs: an illustrated encyclopedia*. pg.47. Ed. Friedman/Fairfax, New York, NY.

- KLAYMAN, D.L.; LIN, A.J.; ACTON, N.; SCOVILL, J.P.; HOCH, J.M.; MILHOUS, W.K.; THEORIDES, A.D. 1984. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J. Nat. Prod.* **47**: 715-717.
- KLAYMAN, D.L. 1985. *Qinghaosu* (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **228**: 1049-1055.
- KLAYMAN, D.L. 1989. Weeding out malaria. *Nat. Hist. Oct.*: 18-26.
- KLEE, H.; HORSCH, R.; ROGERS, S. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**: 467-486.
- KO, K.S.; EBIZUKA, Y.; NOGUCHI, H.; SANKAWA, U. 1988. Production of secondary metabolites by hairy roots and regenerated plants transformed with Ri plasmids. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 4217-4225.
- LÊ, C.L.; COLLET, G.F. 1991. The *in vitro* culture of *Artemisia annua* L. *Recherche Agronomique en Suisse* **31**: 111-116.
- LEE, J.H.; AN, G. 1986. Industrial application and genetic engineering of plant cell cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 260-267.
- LIMA, M.I.S. 1995. Lactonas sesquiterpênicas e sua distribuição em certas famílias como Asteraceae e principalmente *Artemisia*. Palestra proferida na disciplina NV-416 "Tópicos em Plantas Mediciniais", do curso de pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

- MARSHALL, E. 1990. Malaria research - What next? *Science* 247: 399-402.
- MILLER, L.H. 1992. The challenge of malaria. *Science* 257: 36-37.
- MISRA, L.N.; AHMAD, A.; THAKUR, R.S.; LOTTER, H.; WAGNER, H. 1993. Crystal structure of artemisininic acid: a possible biogenetic precursor of antimalarial artemisinin from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 56: 215-219.
- MOORE, L.; WARREN, G.; STROBEL, G. 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2: 617-626.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAIR, M.S.R.; ACTON, N.; KLAYMAN, D.L.; KENDRICK, K.; BASILE, D.V.; MANTE, S. 1986. Production of artemisinin in tissue cultures of *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* 49: 504-507.
- NORTON, R.A.; TOWERS, G.H.N. 1986. Factors affecting synthesis of polyacetylenes in root cultures of *Bidens alba*. *J. Plant Physiol.* 122: 41-53.
- NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V. 1985. Malária: a vacina é possível. *Ciência Hoje* 3: 26-35.
- NUSSENZWEIG, R.S.; LONG, C.A. 1994. Malaria vaccines: multiple targets. *Science* 265: 1381-1382.

- PANIEGO, N.B.; GIULIETTI, A.M. 1994. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 36: 163-168.
- PAYNE, J.; HAMILL, J.D.; ROBINS, R.J.; RHODES, M.J.C. 1987. Production of hyoscyamine by "hairy root" cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med.* 53: 474-478.
- PRAS, N.; VISSER, J.F.; BATTERMAN, S.; WOERDENBAG, H.J.; MALINGRÉ, T.M. 1991. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. *Phytochem. Anal.* 2: 80-83.
- RAINERI, D.M.; BOTTINO, P.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/Technology* 8: 33-38.
- RAVINDRANATH, T.; ANIL KUMAR, M.; MENON, R.; HIREMATH, S.V. 1990. Stereo-selective synthesis of artemisinin. *Tetrahedron Lett.* 31: 755-758.
- ROBERTS, M.F. 1988. Medicinal products through plant biotechnology. In *Manipulating Secondary Metabolism in Culture*, ed. Robins, R.J. & Rhodes, M.J.C., Cambridge University Press, pg. 201-216.
- RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15: 1573-1580.
- ROTH, R.J.; ACTON, N. 1987. Isolation of arteannuic acid from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 53: 501-502.
- ROTH, R.J.; ACTON, N. 1989. A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin. *J. Nat. Prod.* 52: 1183-1185.

- SAITO, K.; YAMAZAKI, M.; MURAKOSHI, I. 1992. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. **J. Nat. Prod.** 55: 149-162.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, vol. 1-3.
- SANGWAN, R.S.; AGARWAL, K.; LUTHRA, R.; THAKUR, R.S.; SINGH-SANGWAN, N. 1993. Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin B and artemisinin in *Artemisia annua*. **Phytochemistry** 34: 1301-1302.
- SCHAFER, W.; GORZ, A.; KAHL, G. 1987. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. **Nature** 327: 529-532.
- SCHMID, G.; HOFHEINZ, W. 1983. Total synthesis of qinghaosu. **J. Am. Chem. Soc.** 105: 624-625.
- SHEPHERD, S.L.K.; FIGUEIRA, G.M.; GURIAN, R.C. 1992. Teste de germinação em *Artemisia annua* L. Programa e Resumos do IX Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Ilha Solteira, SP, pg. 226.
- SINGH, A.; VISHWAKARMA, R.A.; HUSAIN, A. 1988. Evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. **Planta Med.** 54: 475-476.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J.Mol. Biol.** 98: 503-517.

- SPANO, L.; POMPONI, M.; COSTANTINO, P.; VAN SLOGTEREN, G.M.S.; TEMPÉ, J. 1982. Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol. Biol.* 1: 291-300.
- SPENCER, P.A.; TOWERS, G.H.N. 1988. Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry* 27: 2781-2785.
- STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P.C. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- STACHEL, S.E.; ZAMBRYSKI, P.C. 1986. *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* 46: 325-333.
- STAFFORD, A. 1992. New pharmaceuticals from plant cell culture. *Agro-Food Industry Hi-Tech* 2: 9-13.
- TAWFIQ, N.K.; ANDERSON, L.A.; ROBERTS, M.F.; PHILLIPSON, J.D.; BRAY, D.H.; WARHURST, D.C. 1989. Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. *Plant Cell Rep.* 8: 425-428.
- TEMPÉ, J.; CASSE-DELBART, F. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: *Agrobacterium* Ri plasmids. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants", vol. 6: Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, Academic Press, Inc.

- TEPFER, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959-967.
- THOMAS, P.S. 1983. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzymol.* 100: 255-266.
- TITULAER, H.A.C.; ZUIDEMA, J.; LUGT, C.B. 1991. Formulation and pharmacokinetics of artemisinin and its derivatives. *Inter. J. Pharm.* 69: 83-92.
- VALERO, M.V.; AMADOR, L.R.; GALINDO, C.; FIGUEROA, J.; BELLO, M.S.; MURILLO, L.A.; MORA, A.L.; PATARROYO, G.; ROCHA, C.L.; ROJAS, M.; APONTE, J.J.; SARMIENTO, L.E.; LOZADA, D.M.; CORONEL, C.G.; ORTEGA, N.M.; ROSAS, J.E.; ALONSO, P.L.; PATARROYO, M.E. 1993. Vaccination with SPf66, a chemically synthesised vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Lancet* 341: 705-710.
- VAN LAREBEKE, N.; GENETELLO, C.; SCHELL, J.; SCHILPEROORT, R.A.; HERMANS, A.K.; HERNALSTEENS, J.P.; VAN MONTAGU, M. 1975. Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255: 742-743.
- VAN SLOGTEREN, G.M.S.; HOGE, J.H.C.; HOODYKAAS, P.J.J.; SCHILPEROORT, R.A. 1983. Clonal analysis of heterogeneous crown gall tumour tissues induced by wildtype and shooter mutant strains of *Agrobacterium tumefaciens* expression of T-DNA genes. *Plant Mol. Biol.* 2: 321-333.

- VILAINÉ, F.; CASSE-DELBART, F. 1987. A new vector derived from *Agrobacterium rhizogenes* plasmids: a micro Ri plasmid and its use to construct a mini-Ri plasmid. *Gene* 55: 105-114.
- WEATHERS, P.J.; CHEETHAM, R.D.; FOLLANSBEE, E.; TEOH, K. 1994. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnology Lett.* 16: 1281-1286.
- WHIPKEY, A.; SIMON, J.E.; CHARLES, D.J.; JANICK, J. 1992. *In vitro* production of artemisinin from *Artemisia annua* L. *J. of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 1: 15-25.
- WHITE, B.A.; BANCROFT, F.C. 1982. Cytoplasmic dot hybridization: simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. *J. Biol. Chem.* 257: 8569-8572.
- WHITE, N.J.; WALLER, D.; CRAWLEY, J.; NOSTEN, F.; CHAPMAN, D.; BREWSTER, D.; GREENWOOD, B.M. 1992. Comparison of artemether and chloroquine for severe malaria in Gambian children. *Lancet* 339: 317-321.
- WHITE, P.R. 1943. *A Handbook of Plant Tissue Culture*, Jacques Cottell Press, Lancaster, Penn, 277 pg.
- WIRTH, D.F.; ROGERS, W.O.; BARKEY JR., R.; DOURADO, H.; SUESEBANG, L.; ALBUQUERQUE, B. 1986. Leishmaniasis and malaria: new tools for epidemiologic analysis. *Science* 234: 975-979.

- WOERDENBAG, H.J.; PRAS, N.; BOS, R.; VISSER, J.H.; HENDRIKS, H.; MALINGRÉ, T.M. 1991. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* 2: 215-219.
- WOERDENBAG, H.J.; LUERS, J.F.J.; VAN UDEN, W.; PRAS, N.; MALINGRÉ, T.M.; ALFERMANN, A.W. 1993a. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 247-257.
- WOERDENBAG, H.J.; MOSKAL, T.A.; PRAS, N.; MALINGRÉ, T.M.; EL-FERALY, F.S.; KAMPINGA, H.M.; KONINGS, A.W.T. 1993a. Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to ehrlich ascites tumor cells. *J. Nat. Prod.* 56: 849-856.
- WOERDENBAG, H.J.; PRAS, N.; CHAN, N.G.; BANG, B.T.; BOS, R.; VAN UDEN, W.; VAN Y, P.; BOI, N.V.; BATTERMAN, S.; LUGT, C.B. 1994. Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Planta Med.* 60: 272-275.
- WULLEMS, G.J.; MOLENDIJK, L.; OOMS, G.; SCHILPERDORT, R.A. 1981. Retention of tumor markers in F1 progeny plants from in vitro induced octopine and nopaline tumor tissues. *Cell* 24: 719-727.
- XU, X.X.; ZHU, J.; HUNG, D.Z.; ZHOU, W.S. 1986. Total synthesis of arteannuin and deoxyarteannuin. *Tetrahedron* 42: 819-828.

- ZAENEN, I.; VAN LAREBEKE, N.; TEUCHY, H.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86: 109-127.
- ZERBACK, R.; DRESSLER, K.; HESS, D. 1989. Flavonoid compounds from pollen and stigma of *Petunia hybrida*: inducers of the *vir* region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Plant Sci.* 62: 83-91.
- ZHENG, G. 1994. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Med.* 60: 54-57.