

Cultivo, cosecha y procesamiento poscosecha de *Artemisia annua* L.

Growing, harvest and postharvest processing of *Artemisia annua* L.

Lérida Acosta de la Luz^I; Ricardo Castro Armas^{II}

^IDoctora en Ciencias Agrícolas. Investigadora Titular. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Estación Experimental de Plantas Medicinales «Dr. JuanTomás Roig». Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II}Máster en Informática Médica. Investigador Agregado. Centro de Información Farmacéutica (CINFA). CIDEM. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: se presentó una revisión bibliográfica sobre *Artemisia annua* L., hierba utilizada tradicionalmente contra la malaria en numerosas partes del mundo.

OBJETIVO: dar a conocer la importancia y características de cultivo, cosecha y procesamiento poscosecha de esta planta.

MÉTODOS: se muestran los estudios realizados sobre diferentes aspectos esenciales relacionados con el procedimiento del cultivo (semilla, siembra, nutrición, algunas recomendaciones para el control de las malezas, plagas y enfermedades; del riego en el cultivo de esta especie y la cosecha) y el procesamiento poscosecha.

RESULTADOS: en relación con la selección del lugar de cultivo y de la semilla utilizada, estos elementos deben ser estudiados en cada ambiente donde se vaya a introducir su cultivo. Su establecimiento mediante semillero y posterior trasplante o su siembra directa, la fecha y densidad de siembra que permitan un rápido crecimiento y desarrollo, son determinantes en el rendimiento de la masa vegetal y los principios activos. En la búsqueda de altos rendimientos de artemisinina está presente la respuesta a la nutrición y al mejoramiento genético de la planta y en cuanto a la cosecha, se hace alusión a la importancia de encontrar el momento óptimo de esta y el método adecuado, con vistas a obtener mayores volúmenes de hojas, donde están concentrados sobre todo los principios activos. En lo relativo al procesamiento poscosecha se presentan algunas investigaciones relacionadas

esencialmente con el secado del material cosechado en el campo, los requerimientos básicos para la comercialización de la materia prima y las condiciones de envasado y almacenamiento.

CONCLUSIONES: los elementos presentados demuestran la importancia del cultivo de esta especie medicinal.

Palabras clave: *Artemisia annua* L., artemisinina, plantas medicinales, procedimiento del cultivo, procesamiento poscosecha.

ABSTRACT

INTRODUCTION: this is a bibliographic review on *Artemisia annua* L., an herb traditionally used against malaria in many parts of the world.

OBJECTIVE: emphasize the significance and the features of its growing, harvest and postharvest processing.

METHODS: the results from the studies conducted on different essential features are showed related to growing procedure (seed, sowing, nutrition, some recommendations for the control of undergrowths, plagues and diseases, on the irrigation in growing of this species and the harvest) and post-harvest processing.

RESULTS: in relation to choice of the growing place and the seed used, these elements must to be studied in each environment where its growing will be introduced. Its establishment by seedbed and subsequent transplant or its direct sowing, the sowing date and density allowing a fast growing and development, are determinant in performance of plant mass and the active principles. In the search of high performances of artemisinina are present the response to nutrition and to the plant genetic improvement and as regards the harvest we refered to the significance to find its optimal moment and the appropriate method, to obtain great leaves volumes, where are mainly concentrated the active principles. Regarding the postharvest processing there are some researches related essentially to the drying of harvested material in the field, the basic requirements for marketing of raw material and the packing and storing conditions.

CONCLUSIONS: the elements presented demonstrate the growing significance of this medicinal species.

Key words: *Artemisia annua* L., artemisinina, medicinal plants, growing procedure, postharvest processing.

INTRODUCCIÓN

Artemisia annua es una hierba aromática que se destaca entre las especies del género *Artemisia* por ser una excelente e importante fuente de compuestos con actividad antimalárica, acción farmacológica que ha sido demostrada.¹

Aunque de modo tradicional se ha cosechado de forma silvestre, el material vegetal recolectado es muy variable en cuanto al contenido de principios activos, además de que la continua eliminación de los areales silvestres limitaría la fuente de variabilidad genética, primordial para el desarrollo de líneas mejoradas, por lo que

se requiere establecer su cultivo. En esta revisión se analizan y discuten las contribuciones de diferentes investigadores en diversas partes del mundo, al conocimiento de formas de manejo agrícola, tomando en consideración fundamentalmente su ciclo de crecimiento vegetativo y la cosecha final, además de las operaciones poscosecha, como estrategia para incrementar los rendimientos del cultivo y de los principios activos, sobre todo de artemisinina.

A. annua se considera una de las contribuciones más importantes de la herbolaria china; en ningún otro país las medicinas herbolaria y occidental están tan compenetradas en su práctica cotidiana para complementar sus efectos y tan universalmente aceptadas. Resulta una demostración del valor de la tradicional búsqueda y utilización de plantas con efectos medicinales existentes en la flora del planeta.

MANEJO DEL CULTIVO

Selección del lugar de cultivo

Prefiere suelos fértiles y suficiente iluminación; la selección del lugar de cultivo va a depender de donde esté localizada la planta de extracción comercial, porque aunque la concentración de artemisinina en el material cosechado es algo baja, el rendimiento de masa verde total del que se extrae el compuesto químico puede ser de unas 100 t/ha, lo que justifica que la planta procesadora debe estar lo más cerca posible al área de producción a fin de minimizar el costo de la transportación. Si se estima que la cosecha va a ser mecanizada, entonces hay que prever además la elección de áreas relativamente planas.²

Selección de las semillas

En cuanto al poder germinativo de las semillas de *A. annua*, se conoce que en general mantienen su vigor al menos por 3 años, si son almacenadas bajo condiciones frescas y secas. Una planta produce entre 60 y 120 g de semillas maduras que pueden sembrarse el mismo año o el próximo.³

Algunos investigadores plantean que como se ha demostrado que el contenido de artemisinina tiene amplia variabilidad, desde 0,01 hasta cerca de 1,5 %, se requiere seleccionar semillas de alta producción de artemisinina acopladas a características agronómicamente adecuadas, que incluyen plantas vigorosas de hojas grandes que proporcionen altos rendimientos de materia seca, resistencia a las enfermedades y momento de floración deseable para la región; por eso hay que hacer una buena evaluación del material de propagación y calidad de las semillas.^{4,5}

Se ha valorado la posibilidad de obtener plantas con mayores concentraciones de artemisinina mediante la técnica del cultivo *in vitro* en laboratorio,⁶ pero la mejor estrategia, menos costosa y de menor tiempo es evaluar los factores agronómicos que tienen relación con el cultivo exitoso de la planta como los estudios agrícolas efectuados en la India,^{7,8} EE. UU.,⁹⁻¹² Holanda,¹³ Suiza,^{4,14} Australia (Tasmania),¹⁵⁻¹⁷ Brasil,¹⁸ Madagascar⁵ y Japón.¹⁹

Para la selección de las líneas que respondan a estas características, se han realizado estudios basados en plantas introducidas en los países que han llevado a cabo investigaciones y en las obtenidas de líneas promisorias introducidas de los lugares de donde es oriunda, por ejemplo China y Vietnam, así como también

mediante el acceso a híbridos con altos contenidos de artemisinina (1,1 %) y bajo vigor, logrados de clones chinos con el de bajo contenido de artemisinina (0,04-0,22 %), pero con alto vigor de clones europeos,^{4,20} aunque se menciona que los más recientes híbridos entre selecciones chinas y vietnamitas con más alto contenido de artemisinina (1,0-1,5 %) están disponibles en una extensión limitada.⁵

Establecimiento del cultivo

Aunque *A. annua* ha sido cosechada de manera silvestre de modo tradicional, de esta forma resulta muy variable en cuanto al contenido de los constituyentes químicos, otro factor negativo es que la distancia de transportación a menudo es antieconómica, porque se trata de una planta con un contenido relativamente bajo de artemisinina, pero con una masa grande de material vegetal, a lo que hay que añadir que la continua eliminación de los areales silvestres limitarían la fuente de variabilidad genética que es vital para el desarrollo de líneas mejoradas, por lo cual exponen que en *A. annua* se requiere establecer su cultivo,²¹ en el presente se ha publicado que como sembrado en hileras algunas líneas seleccionadas se han cultivado con éxito.³

Siembra mediante semillero y trasplante

Algunos investigadores hacen referencia a la plantación de *A. annua* mediante estacas,¹² pero en la mayoría de los estudios realizados los investigadores prefieren hacer los semilleros y luego trasplantar, para lo cual recomiendan efectuarlos en bandejas poco profundas (5-6 cm) colocadas en un invernadero. Se aconseja para su llenado utilizar una mezcla esterilizada de dos partes de arena, dos partes de turba y una parte de vermiculita, ajustar el pH a 6,0-7,0, para luego distribuir las semillas de manera uniforme en la superficie y cubrirlas con ligera capa de vermiculita (1-2 mm), manteniendo la superficie con suficiente humedad. Cuando las plántulas alcanzan unos 2 cm de altura (tienen 4-5 hojas verdaderas), lo que demora alrededor de 3 semanas, se seleccionan procurando no dañar las raíces y se trasplantan a otros recipientes utilizando la misma mezcla citada antes, donde se mantienen por unas 4 semanas hasta que tengan aproximadamente 10 hojas verdaderas y alcancen alrededor de 15 cm de altura; después de esto las posturas están lo suficiente fuertes para ser sacadas fuera del invernadero a una casa de sombra durante 3 a 5 d para con posterioridad ser trasplantadas a campo abierto, es decir, que desde el proceso de siembra al trasplante transcurren alrededor de 2 meses.²

En el documento sobre *Buenas Prácticas Agrícolas* y de recolección de esta planta emitido por la OMS²² se reporta que el área de semillero debe ser alrededor de 1,5 % del área de plantación y se utilizan 0,4-0,5 g semillas/m², las que germinan en un período de 10 a 15 d, con una germinación alrededor de 90 %. Se añade que el suelo del semillero debe permanecer con suficiente humedad al menos durante la primera semana de la siembra y a diferencia de lo que otros plantean, las posturas permanecen en el sitio donde se realizó el semillero hasta que alcancen unos 15 cm de altura cuando se trasplantan directamente al campo.¹²

Existen pocas referencias sobre la edad óptima para llevar a cabo este trasplante, pero lo esencial es que las plantas estén lo suficientemente robustas para hacerle frente al estrés que sufren por esta operación y a la susceptibilidad del daño por el viento, por lo que se sugiere que este aspecto debe ser estudiado en cada ambiente donde se vaya a introducir el cultivo de *A. annua*.

Siembra directa

Es el método más económico de establecimiento de la planta, siempre y cuando se cuente con la cantidad de semillas disponibles y se tengan presentes otros factores como es el control de las malezas. En Alemania, se sembró *A. annua* directamente en campos experimentales de forma exitosa, las pruebas se hicieron en la tercera semana de junio y la completa floración se observó a final de agosto;²³ también se experimentó en Australia (Tasmania) la siembra directa de las semillas, esta forma de cultivo proporcionó rendimientos de hojas secas y de artemisinina similares a los obtenidos en siembra de trasplante en dos experimentos llevados a campo en los que la siembra y el trasplante tuvieron lugar a mediados de octubre (la primavera), además en ambos las plantas adquirieron su estado de madurez y fueron cosechadas al inicio de la etapa de botonación, final de febrero (el verano), 4,5 meses más tarde.^{15,16} De igual forma se reportan siembras directas en Vietnam en enero, que mostraron estado de floración en octubre.²⁴

Pocos estudios existen sobre *A. annua* y la posibilidad de la siembra de las semillas en otoño y la supervivencia de las plántulas durante el invierno, en zonas geográficas donde esta técnica puede ser apropiada; sin embargo, alguna información es posible añadir por los resultados en las pruebas realizadas en Tasmania (Forthside 41° 12' S), con semillas de una línea yugoslava que germinó en el campo en otoño (al final de abril) y las jóvenes posturas sobrevivieron muy bien al invierno, crecieron fuertemente en primavera, pero no florecieron hasta final de febrero del año siguiente.³

Otro aspecto importante a considerar es el tamaño de las semillas, como las de *A. annua* son muy pequeñas (10-15 000 por gramo), para su distribución uniforme se deben mezclar con algún material inerte o con un fertilizante neutral apropiado. En experimentos en Tasmania, se recomienda la mezcla 50:50 de caliza bien molida con superfosfato, para un establecimiento exitoso.¹⁵

La profundidad de siembra es igualmente un parámetro crítico en el caso de las semillas pequeñas; en los estudios en Tasmania, una profundidad de 5 mm ofreció buenos resultados; de igual modo es esencial que el área permanezca lo suficiente húmeda para asegurar que las plántulas no sufran estrés hídrico o de quemaduras por la fertilización, además, se requiere conocer el poder germinativo de la semilla determinado en el laboratorio para usar la tasa de siembra adecuada.²

Finalmente, el éxito de la siembra directa de esta planta dependerá del conocimiento detallado de la planta en cuanto a un rápido crecimiento y desarrollo que le permita cubrir el área antes de que las hierbas la invadan, también del suelo y de las condiciones ambientales locales como son las precipitaciones y la temperatura.

Establecimiento del cultivo en diferentes altitudes

En Penang, Malasia (5° 30'N), estudiaron en una línea de Hanoi su comportamiento en las latitudes bajas y cercanas al nivel del mar. Las plantas a las 3 semanas fueron trasplantadas a parcelas de campo y la floración ocurrió a las 14 semanas de edad con un máximo contenido de artemisinina de 0,39 % una semana antes de florecer.²⁵ Es de destacar, que aunque en el experimento no se estudió detalladamente el rendimiento de materia seca de hoja, las plantas cultivadas alcanzaron 1 m de altura; sería conveniente hacer estudios en latitudes bajas para explorar el potencial de rendimiento de la planta, así como también de ser posible probar en los países tropicales con crecimiento muy rápido la posibilidad de dos cultivos al año sugerida para Vietnam²⁴ y Brasil.²⁶

De igual modo en Madagascar, en Antanaviro (latitud 18° 52'), a una altura de 1 500 metros sobre el nivel del mar, se trasplantaron a parcelas de campo las posturas de *A. annua*, resultantes de un cruzamiento entre plantas de origen chino y vietnamita, y para el 4 de agosto fueron cosechadas plantas en estado de madurez que produjeron rendimientos de hojas secas de 4,7 t/ha y de artemisinina de 41,3 kg/ha.²⁷

Fecha de siembra.

Es una decisión importante donde se debe tener en cuenta que la elegida le permita a la planta el rápido crecimiento y un desarrollo vegetativo vigoroso antes del comienzo de la floración. En clima continental, el buen crecimiento y rendimiento fueron obtenidos cuando la planta se sembró en inicios del verano en Alemania²³ y EE. UU.²⁸ y a final de la primavera en Suiza.⁴

En un clima marítimo templado fresco en Australia (Tasmania), en un experimento de campo, se comparó el trasplante en los meses primaverales de octubre y noviembre con inicios del verano en diciembre, y se encontró que el rendimiento de materia seca de hojas de los trasplantes de octubre resultaron el doble y cuádruple del de los trasplantes de noviembre y diciembre, respectivamente, pero la concentración de artemisinina fue igual para las tres fechas de establecimiento y la del ácido artemisinico disminuyó en 25 % para el trasplante de noviembre y en 50 % para el de diciembre en comparación con los de octubre. En posteriores experimentos este investigador comparó el trasplante en invierno (julio y agosto) con trasplantes en primavera (septiembre y octubre) y no encontró diferencias en los rendimientos de hojas secas, artemisinina, ácido artemisinico en las tres fechas estudiadas.¹⁵

El mismo investigador adiciona que en la India, *Lucknow*, con posturas de la misma selección europea utilizadas en el experimento de campo en Tasmania descrito con anterioridad, las que se trasplantaron en el período de invierno relativamente fresco de mediados de diciembre; para el 26 de marzo las plantas alcanzaron plena floración y rendimiento máximo de materia seca de hojas y flores, también de artemisinina.¹⁵

En otro experimento de campo realizado con semillas nativas del nordeste de Vietnam que se llevaron cerca de Hanoi, en el cual *A. annua* fue sembrada directamente en el campo, el 10 de enero, se evaluó el rendimiento seco de material vegetal y el contenido de artemisinina. El máximo rendimiento de hojas secas, 5,3 t/ha, se obtuvo el 15 de junio, en la etapa vegetativa, así como la máxima concentración y rendimiento de artemisinina (0,86 % y 45,4 kg/ha, respectivamente); las plantas permanecieron en este estado hasta la etapa de botonación el 15 de octubre, cuando hubo un rendimiento de materia seca de hojas de 3,8 t/ha y la concentración de artemisinina fue de 0,42 %.²³

De ese estudio se puede concluir que esta línea de *A. annua* adaptada al ambiente tropical vietnamita proporcionó una biomasa adecuada, con alta concentración de artemisinina lograda durante la etapa vegetativa, antes del inicio del período de floración.

En posteriores trabajos sobre la fecha de establecimiento de esta especie, otros llegaron a plantear que el momento óptimo de trasplante en las llanuras del norte de la India, era a mediados de octubre.²⁹

Densidad de población

La densidad de población y la determinación de la mejor distancia entre plantas y entre surcos son de importancia considerable y determinantes en el rendimiento de *A. annua* y la práctica para el control de las malezas. Espaciamientos entre 0,5 a 1,0 m pueden ser los apropiados para el control de las hierbas, pero si se van a emplear herbicidas entonces se pudieran utilizar densidades de población mayores; en algunos estudios preliminares se han experimentado densidades de 1 pl/m²,^{2,30,31} y de 2,5 pl/m² donde se alcanzaron rendimientos de 1-4 t/ha de hoja seca.^{2,30,31} En otros estudios se probaron densidades mayores, 7 y 11 pl/m², y se logró mayor biomasa;¹³ en tanto que en Madagascar, en parcelas de campo con espaciamiento de 50 x 70 cm equivalente a unas 8 pl/m², lograron rendimientos de hojas secas de 4,7 t/ha.²⁷

En Australia (Tasmania), en un experimento de campo con una línea yugoslava de trasplante en noviembre, se realizó un estudio donde se compararon 1, 5, 10, 15, 20 pl/m² y se encontró que el rendimiento de materia seca de hoja se fue incrementando hasta la densidad de 20 pl/m², aunque destacó que en la de 10 pl/m² el rendimiento fue alrededor de 90 % del máximo de 6,8 t/ha, o sea, 6,1 t/ha.¹⁵ En posteriores trabajos algunos investigadores han informado que esta planta debía ser cultivada con altas densidades, ellos obtuvieron en un experimento de campo en Vietnam con densidad de 25 pl/m² un máximo rendimiento de hoja seca de 5,3 t/ha,²⁴ igualmente se ha recomendado para las llanuras del norte de la India altas densidades de población, alrededor de 22 pl/m².³²

Aunque en el estudio de Australia con la línea yugoslava, la densidad de población no tuvo efectos en la concentración de artemisinina, ni en la del ácido artemisinico, esto puede ocurrir en otras regiones climáticas y con otras líneas de *A. annua*; además, como se planteara con anterioridad, sí tiene efecto sobre el contenido de aceite esencial,³³ por lo que se considera que sería importante realizar investigaciones al respecto.

Otro aspecto que había sido recomendado desde 1990 y valdría la pena investigar, sería el efecto de la variación que pueda ocurrir por la rectangularidad del área, o sea, la proporción de los espaciamientos entre plantas y entre surcos, en una constante densidad de población.³⁴

La OMS expone que se pueden adoptar diferentes densidades de población, desde distanciamientos de 15 x 15 cm hasta 45 x 75 cm, en dependencia de la experiencia adquirida y los factores correspondientes con países y regiones, pero que su selección debe basarse fundamentalmente en el rendimiento de artemisinina por unidad de área.²²

El análisis de los resultados mostrados en las diversas investigaciones realizadas con diferentes líneas de *A. annua* de distintas localidades permite enfatizar que entre los aspectos agrícolas, la densidad de población es fundamental para la planta y es un aspecto vital cuando se vayan a establecer nuevos cultivos, porque para algunos las altas densidades entre 22 y 25 plantas/m² resultan las más convenientes, en tanto que otros señalan que con densidades alrededor de 10 plantas/m² se obtienen resultados satisfactorios.

Nutrición de las plantas. Elementos mayores

Buenos rendimientos de masa verde y seca relacionados con los elementos principales N, P, K, se han informado, pero un número pequeño de estudios hacen alusión a la respuesta en cuanto al crecimiento vegetativo o sus efectos sobre la concentración de artemisinina y otros compuestos.

De esta manera se ha planteado que se han obtenido buen crecimiento y alto rendimiento de materia seca de hoja en EE. UU. (Mississippi) con una mezcla de fertilizante completo a razón de 100 kg N, 100 kg P y 50 kg K, aplicado en presiembra en bandas, a 150 mm y a 50 mm debajo de las semillas, y 75 mm debajo de las posturas trasplantadas, e igualmente en Australia (Tasmania) con una mezcla de 60 N, 60 P y 50 K.^{15,31}

La técnica de aplicación en bandas es generalmente recomendable en suelos donde la fijación de fósforo constituye un problema. Aunque no hay datos experimentales específicos sobre la respuesta para este elemento y para el potasio, hay algunas pruebas específicas para el nitrógeno, como son los estudios practicados en EE. UU. (Indiana), donde se compararon diferentes proporciones de N: 0, 67, 135 kg/ha y se presentó el mayor rendimiento para la dosis de 67 kgN/ha.¹⁰

En el mismo período en la India, en un cultivo en suelo arenoso de una línea americana, también demostraron que la deficiencia de nitrógeno estuvo asociada con una gran disminución de la artemisinina. De manera similar, en estudios hidropónicos realizados en Brasil se llegó a igual conclusión, que la omisión de forma drástica de nitrógeno o también de fósforo redujo el crecimiento y la producción de materia seca.³⁵

En posteriores pruebas en campo se compararon dosis de 0, 32, 64 y 97 kg N/ha aplicados en forma de urea y se encontró que el rendimiento de materia seca de hoja se incrementó con la mayor proporción de nitrógeno, pero que la concentración de artemisinina disminuyó 22 %, además, el rendimiento máximo de artemisinina estuvo dado por la dosis de 64 kg N/ha; lo que representó en comparación con las parcelas donde no se aplicó el nitrógeno un incremento por encima de 50 % de artemisinina.²⁷

Al parecer, el nitrógeno, que es un elemento muy móvil, fácilmente lavado de la zona de la raíz, en especial en áreas de altos períodos de concentración de lluvia efecto que puede ser muy significativo en las regiones tropicales y subtropicales, bajo estas condiciones es de suma importancia el método y el momento de aplicación, por lo que para ocasionar menor lavado se recomienda que en áreas de mucha humedad, se adicione cerca de las semillas o de las hileras de plantas, así como también en dosis compartidas.

En cuanto a la aplicación de diferentes formas de nitrógeno al suelo y su influencia sobre *A. annua* mediante un experimento de campo montado en suelo arenoso en Suiza, hicieron una comparación entre diferentes portadores nitrogenados: sulfato de amonio y nitrato de amonio, aplicados en dosis de 90 kg N/ha en ambas formas de fertilizantes y se registraron incrementos de rendimiento de materia seca de hojas y de artemisinina de alrededor de 50 %.²⁶ Los resultados encontrados por estos investigadores en otro experimento llevado a cabo en un hidropónico, sugirieron que bajo algunas condiciones el fertilizante nitrogenado en forma de nitrato puede dar rendimientos más altos de artemisinina que la forma amoniacal, por lo que para poder dilucidar adecuadamente este aspecto, aconsejan que más investigaciones de campo en diferentes tipos de suelos deben ser realizadas.²

De igual modo en estudios efectuados por los brasileños se expone que la omisión de cualquiera de estos elementos: N, P, K, Ca, Mg, S en las soluciones de nutrientes limitan la producción de la artemisinina y del ácido artemisinico.^{36,37}

A pesar de la poca información recopilada en relación con el papel que desempeñan los fertilizantes en el cultivo de *A. annua*, por los estudios realizados en maceta y campo que se han analizado en esta reseña, se puede inferir que el nitrógeno

constituye un elemento fundamental, porque proporciona incrementos en los rendimientos de materia seca de hojas y de artemisinina.

Mejoramiento genético

Muchas plantas silvestres usualmente presentan gran variabilidad genética que le permite, como en el caso de los metabolitos secundarios, hacer mejoras exitosas; un paso importante es la domesticación y el mejoramiento genético. En *A. annua* se considera que lo fundamental es su mejoramiento en cuanto al contenido de artemisinina, para lo que se requiere escoger el mejor programa, donde se pueda predecir y sea estimada la heredabilidad del contenido de este principio activo.³⁸

En las hojas de las diferentes líneas de *A. annua* ha sido observada una gran variabilidad en el contenido de artemisinina, desde 0,02 hasta 1,38 % en las hojas secas, variación que tiene varias causas: la utilización de diversos métodos para la extracción y el análisis, la colecta y la preparación de las muestras, especialmente la separación de las hojas del tallo son también muy variables, de igual modo es bien conocido que el contenido de artemisinina en la planta cambia durante la época; una parte de la variación se debe a la cosecha en las diferentes etapas de crecimiento, en diferentes fechas, además de la influencia de los factores ambientales, sobre todo la temperatura, como ya se ha mencionado. La variación observada es tan considerable que se debe pensar que una base genética está también involucrada, para lo cual es necesario cuantificar su significado mediante el cultivo de diferentes líneas de *A. annua* en igual ambiente y usar el mismo método de análisis para su determinación, además de tener presente hacer estudios relacionados con diferentes técnicas de mejoramiento genético.^{25,39-41}

Algunos investigadores manifiestan que diferentes variedades de semillas han sido adaptadas mediante mejoramiento y se ha logrado que su cultivo sea exitoso en numerosos países tropicales, por ejemplo, en el Congo,⁴² la India⁴³ y Brasil.⁴⁴⁻⁴⁶

Respecto a la búsqueda mediante mejoramiento genético de plantas con altos rendimientos de artemisinina en *A. annua*, se realizó una prueba preliminar donde se cruzaron dos líneas con diferentes concentraciones de artemisinina. Las plantas de la progenie presentaron contenidos muy variables, pero generalmente fueron valores intermedios a los encontrados en los progenitores; sin embargo, en la segunda generación hubo un incremento en la variación y ya no se pudo hacer la clasificación individual de las plantas según su contenido de artemisinina, lo que sugiere una segregación clásica de los componentes genéticos e indicó la necesidad de usar un modelo de genética cuantitativa para describir los antecedentes genéticos que gobiernan estos rasgos en las especies.²⁰

Con posterioridad se hace alusión a que en 1989 y 1990 se habían efectuado en Suiza pruebas comparativas con plantas de orígenes diversos y que fue encontrada gran variabilidad en su contenido de artemisinina, con cantidades desde 0,05 a 1,07 % en las hojas secas.⁴

Otros investigadores también desarrollaron en Brasil estudios sobre el mejoramiento de *A. annua*, que incluyó la selección y el mejoramiento de genotipos ricos en artemisinina y con gran producción de biomasa, seguido de una segunda selección para adaptación al clima de ese país. La hibridización controlada entre los genotipos seleccionados de China y Vietnam produjo población uniforme en cuanto a contenido de artemisinina y biomasa en la población base, e incremento de la producción de 5 kg/ha para alrededor de 25 kg/ha en la población mejorada genéticamente. A la postre, cuando se realizó el cultivo en Brasil de tres líneas híbridas, produjeron rendimientos de artemisinina de 21,38; 19,27 y 15,80 kg/ha;

debido a la producción obtenida llegaron a la conclusión de que el cultivo de estas tres líneas era técnicamente viable y muy competitivo.⁴⁶

Como puede observarse, la cantidad de metabolitos secundarios en una planta es el resultado de un proceso muy complicado que involucra la senda completa de biosíntesis de la molécula y su acumulación en la planta, a menudo en una estructura especializada.

Acerca de la biosíntesis de la artemisinina, hay opiniones divergentes concernientes a la senda completa, en especial el posible papel que desempeña el ácido artemisinico como precursor.^{13,47-51} Es obvio que varios pasos están involucrados en la biosíntesis de la artemisinina y es probable que cada uno esté regulado genéticamente. Sobre la localización de la molécula en la planta, hoy está establecida su presencia en los tricomas glandulares en la superficie de las hojas, así como también en la corola y el receptáculo.⁵²⁻⁵⁴ En la genética cuantitativa, lo que se trata de determinar es precisamente la variación total que puede ocurrir por los factores genéticos, lo cual se conoce como heredabilidad.

Otros investigadores acometieron estudios sobre mejoramiento genético, donde indujeron tetraploidía mediante colchicina en plantas de *A. annua* y compararon su comportamiento durante todo el período del desarrollo con el de las plantas silvestres (plantas diploide), y observaron que las plantas tetraploides fueron más pequeñas, por lo que el rendimiento promedio de biomasa fue menor, pero ciertos órganos individuales como las hojas resultaron considerablemente mayores que las de las plantas silvestres; además las semillas obtenidas mediante la polinización cruzada entre las plantas tetraploides tuvieron un tamaño espectacular. En cuanto a los niveles promedio de artemisinina determinados en el período de completa vegetación, en las plantas tetraploides, fue 38 % superior al de las diploides; en tanto que los del aceite esencial fueron 32 % más bajo en las plantas tetraploides, lo que sugiere que hay una correlación inversa entre la artemisinina y el aceite esencial. Como los niveles promedio de biomasa en las plantas tetraploides fueron menores que en las diploides, el rendimiento promedio por metro cuadrado decreció en 25 %.⁵⁵

Los resultados obtenidos sugieren que, en un principio, las plantas tetraploides de *A. annua* pudieran servir para ser utilizadas como material para un programa de mejoramiento genético con el propósito de obtener mayores rendimientos de la planta y el consiguiente incremento en los de artemisinina.

También con el fin de seleccionar plantas de *A. annua* con altos rendimientos de artemisinina se han desarrollado técnicas de cultivo de tejidos, al respecto se realizaron estudios en los cuales observaron que se produjo un contenido variable de artemisinina en las plantas cosechadas durante el período de prefloración, esto les permitió hacer selección y clonación entre las plantas y mediante comparación estadística agrupar los clones por su contenido de artemisinina en altos (0,41-0,42 %), moderados (0,25-0,26 %) y bajos (0,13 %).²⁵

De igual modo, se ha señalado que mediante esta técnica se obtuvieron plantas de selecciones vietnamitas que crecieron en invernadero a mediados de diciembre de 1994, con posterioridad estas plantas fueron llevadas a campo a mediados de febrero de 1995 para determinadas localizaciones cerca de *Devonport* y cultivadas vegetativamente durante el otoño; se observó que las plantas sobrevivieron al invierno sin problemas durante el crecimiento vegetativo, el cual se mantuvo a lo largo de la próxima primavera y se logró lo siguiente: alcanzar una altura de 2 m, no comenzar a florecer hasta final de febrero en 1996 aunque solo en algunas plantas, y que ninguna de las flores de estas plantas produjeran semillas viables.²

Estudios desarrollados mediante cultivo *in vitro* con similar objetivo, donde partieron de semillas del norte de Vietnam germinadas y continuamente propagadas mediante cultivo de tejido, luego a las 3 semanas las plántulas fueron trasplantadas desde el laboratorio al campo bajo condiciones de clima tropical y después fueron muestreadas en diferentes estados de crecimiento. En estas plantas se observó que alcanzaron poca altura (100 cm), floración temprana (a las 14 semanas), lapso breve de desarrollo (18-28 semanas), no produjeron semillas y además presentaron contenido de artemisinina variable; las mayores concentraciones se encontraron en las hojas de plantas de 12 semanas (0,13-0,31 %) y 13 semanas (0,12-0,39 %) durante el período de prefloración.²⁵

Control de las malezas

Para el control de las malezas en el cultivo de *A. annua* en áreas pequeñas, en países en desarrollo, la forma manual ha sido la apropiada y, consecuentemente, debe pensarse en espaciamiento entre surcos que permitan el fácil acceso, mientras las plantas son pequeñas y no han cubierto el área. En el documento sobre las *Buenas Prácticas Agrícolas* y de recolección de la OMS (WHO, 2005), se hace referencia a que el primer deshierbe se realizó alrededor de los 20 d después del trasplante y un segundo cuando ha emitido las ramas principales; una vez que las plantas crecen y el campo cierra, no requiere de más limpiezas.²²

Otro aspecto que también hay que tener presente es que en las economías desarrolladas, donde las regulaciones gubernamentales permiten la utilización de herbicidas para el control de las malezas, se requiere hacer investigaciones para su adecuada aplicación. Algunos manifiestan que sería factible el control químico de las malezas y exponen que algunos experimentos sobre el empleo de herbicidas se han realizado en EE. UU., los cuales han proporcionado su buen control sin causar fototoxicidad, tanto en tratamientos preemergente y posemergente, sin que se haya manifestado reducción significativa del rendimiento de hojas y de la concentración de artemisinina.⁵⁶

Se hace énfasis en que fundamentalmente resulta de gran utilidad la aplicación de herbicidas en las etapas de inicio de crecimiento, cuando se hace siembra directa de las semillas, aspecto que resulta más crítico que cuando se establece el cultivo mediante trasplante, por el lento crecimiento de las diminutas plántulas que brotan de las semillas en las semanas iniciales, las que durante esta etapa pueden ser ahogadas de modo fácil por las malezas.³

En fin, las hierbas, que son una constante problemática para los cultivos en todo el mundo, se debe tener presente cómo van a ser controladas antes de establecer el de *A. annua*.

Plagas y enfermedades

Muy poco se ha publicado sobre la infestación en *A. annua* por plagas y enfermedades;² existen reportes sobre una amplia selección de experimentos realizados en EE. UU., donde se hicieron monitoreos fitopatológicos durante todas las etapas del desarrollo de las plantas; etapa vegetativa, la de producción de flores y semillas y que en ninguna de ellas se registró síntomas de infestación por estos patógenos; los únicos insectos observados fueron larvas de lepidópteros, pero sin ocasionar daños significativos visibles. En tanto que en Australia (Tasmania), también en una variedad de experimentos similares, la única enfermedad observada en algunas de las pruebas fue la baja incidencia de infección en la parte basal del tallo con *Sclerotinia*, por lo que se sugiere que debido a ello, se deben considerar adecuadas medidas de control cuando se cultive *A. annua* con alta

densidad de población, porque bajo estas condiciones se proporciona alta humedad favorable para inducir la infestación.^{9,57}

En Arabia Saudita fue identificado a *Orobanche cernua*, el cual afectaba a *A. annua* como un parásito de la raíz que puede causar pérdidas potenciales.⁵⁸

En el documento sobre las *Buenas Prácticas Agrícolas* de esta planta (WHO, 2005), se hace mención a enfermedades virosas ocasionadas por áfidos que provocan hojas disminuidas y malformadas, así como una enfermedad que ocurre con frecuencia 1 mes después del trasplante, que origina daños en la raíz y finalmente la planta muere; en tal sentido como medida de control se aconseja en el documento que en los campos donde se cultive *A. annua* se haga rotación de cultivo cada 2 años.²²

Riego

A. annua tiene abundantes y densas raíces laterales que le permiten gran adaptabilidad y capacidad contra la sequía y el anegamiento; a pesar de ello el riego de este cultivo para el mantenimiento de la humedad adecuada es importante, ya sea mediante siembra directa o de trasplante. En muchas situaciones como es el período de germinación y la fase preliminar de crecimiento, es necesaria la irrigación frecuente y ligera para su establecimiento seguro; la frecuencia de esta aplicación dependerá mucho del tipo de suelo y del clima, luego de la aparición de la sexta hoja no requiere de mucho riego.²²

Se conoce muy poco sobre el efecto del riego en el contenido de artemisinina, en tal sentido, se pudo comprobar que la eliminación del riego durante las 2 semanas antes de la cosecha produjo reducción de su concentración.⁵⁹

El estrés hídrico en los períodos críticos del desarrollo puede causar reducciones de crecimiento en muchas plantas, así como retardar o disminuir las etapas de floración y reproducción e influir sobre los principios activos, por eso se necesita realizar más trabajos sobre los requerimientos de riego de *A. annua*, para definir su aplicación en las etapas críticas de crecimiento de la planta en un rango de ambientes, especialmente su efecto en el rendimiento de materia seca de hoja y en la concentración de artemisinina, del ácido artemisinico y del aceite esencial.

Momento de cosecha

El momento óptimo de cosecha en *A. annua* va a depender de la finalidad del compuesto principal. Si lo que se quiere es artemisinina, en la mayoría de los estudios anteriormente citados el rendimiento máximo está en las plantas en completa floración;^{6,8,11,12,15} aunque en el caso de la selección vietnamita, en una prueba en ese país, el rendimiento máximo de artemisinina se encontró en las plantas en etapa vegetativa.²⁴

Si el ácido artemisinico fuera el objetivo principal, por la limitada cantidad de datos disponibles en el presente, es la etapa vegetativa tardía donde se encuentra el máximo rendimiento como atestiguan los resultados,^{15,16,24} pero si el interés es por el aceite esencial o el doble propósito: aceite esencial y ácido artemisinico, entonces el estado de completa floración es el preferido; no obstante, en este caso sería importante utilizar una selección de *A. annua* que no muestre gran disminución del ácido entre la etapa vegetativa tardía y la completa floración, como fue señalado en el estudio relacionado con el efecto de diferentes prácticas agronómicas en el cultivo.¹⁵

En la investigación efectuada sobre la acumulación estacional de artemisinina¹¹ y también en las llevadas a cabo con plantas obtenidas de cultivo de tejido en invernadero y en cultivo en campo y su relación con el contenido de artemisinina, se obtuvo la mayor acumulación en la etapa de botonación,^{12,54,60-62} en tanto que en el documento sobre *Buenas Prácticas Agrícolas* se informa que el rendimiento de hojas y el contenido de artemisinina se incrementan gradualmente antes de la floración y disminuye después de esta, por lo que el período óptimo de cosecha ocurre en la botonación, alrededor de los 6 meses después del trasplante.²²

Métodos de cosecha.

Existe poca información detallada sobre el método de cosecha en *A. annua*. En China y Vietnam, los dos países donde la planta se ha cultivado tradicionalmente, se reporta que para la cosecha la planta se corta en la base, se deja desecar y luego se remueven las hojas mediante alguna forma de sacudida.²²

Este método de cosecha, cortando cerca de la base y dejándola para perder humedad por un período de tiempo que depende de la región climática de producción, tiene la ventaja de la gran pérdida de humedad (hasta 50 % o más) y, por lo tanto, la reducción en el acarreo, el costo y tiempo de secado.⁶³

Así mismo, se hace referencia a que uno de los primeros intentos de corte mecanizado en esta planta se realizó en EE. UU.; para las pruebas se sembraron 2 hectáreas en surcos con 90 cm de separación con el objetivo de producir 1 kg de artemisinina, los resultados revelaron que la plantación fue exitosamente cortada en la base con una segadora movida por un tractor.³⁰

Algunos estudios preliminares efectuados en Australia, Tasmania, con el uso de una segadora de campo estándar acoplada con un disco cosechador de granos verdes los resultados fueron prometedores, aunque ocurrieron obstrucciones en estas pruebas con una máquina donde no se modificó el sistema,^{16,17} y se sugiere explotar este método con las modificaciones correspondientes en los implementos.

La importancia de encontrar métodos alternativos adecuados de cosecha radica en el volumen de tallo principal y ramas laterales que debe ser manipulado, así como el bajo contenido de artemisinina en ellos. En plantas en estado vegetativo tardío se evaluó la contribución de hoja fresca del total de la masa cosechada y se determinó que fue solo de 26,9 % en el estudio vietnamita;²⁴ en Tasmania, donde el máximo rendimiento fresco ocurrió en completa floración, del rendimiento total de la masa cosechada, 29 % fue de hojas y 17 % de flores.¹⁷

Otra técnica de cosecha a emplear sería hacerla como si fuera forraje, para lo cual se corta la planta cerca de la base o en cualquier altura requerida, luego es picada mecánicamente en trocitos e inflada y arrastrada a un depósito. La segunda etapa de este método involucra horno o alguna forma alternativa de secamiento antes de la separación de las hojas y flores. Este sistema ha recibido un cribado muy preliminar en Tasmania y aunque es factible involucra el problema del acarreo, la manipulación y el secado del material vegetal cosechado.²

Como en las hojas y las flores de *A. annua* es donde están concentrados fundamentalmente la artemisinina, el ácido artemisinico y el aceite, la técnica ideal de cosecha sería alguna forma de separación mecánica de estos componentes de la planta. También es importante tener presente que independiente al sistema de cosecha utilizado, sería conveniente que la instalación para secado y manipulación esté ubicada cerca del área de producción, porque la masa cosechada puede

calentarse de modo rápido y podría haber pérdidas de artemisinina; no se hallaron estudios publicados relacionados con este aspecto que merecieran atención.

Procesamiento poscosecha

Respecto a la poscosecha, se han realizado fundamentalmente investigaciones relacionadas con el secado de esta planta. Estudios de secado al aire y sombra se reportan en diferentes partes del mundo. En EE. UU. cosecharon plantas enteras de *A. annua* con una segadora, que después fueron transportadas para un sombreador grande donde se colgaron para su desecación.³⁰ También en la India (Lucknow), experimentaron cortando las plantas en la base, luego la trocearon mecánicamente en pequeños segmentos para con posterioridad secar el material a la sombra; antes de la extracción se tamizó el material para eliminar un gran porcentaje de tallos.⁸ En estudios más recientes realizados en Madagascar, plantas completas fueron secadas de modo similar bajo cubiertas antes de la extracción de las hojas.²⁷

De igual modo, se ha experimentado sobre el secado del material cosechado en el campo con exposición directa al sol, pero se considera que con este método se reduce el contenido de artemisinina. Hay investigaciones desarrolladas en Oregón, EE. UU., sobre el efecto del secado de hojas o de ramas a pleno sol; en el sol, pero al abrigo de bolsas de papel y a la sombra, se registró durante el estudio que la temperatura máxima del aire fue de 30 °C y las temperaturas en las muestras al sol 42,2 °C, a la sombra 22,8 °C y al sol, pero protegidas, 35,6 °C. Con el secado al aire y sombra se encontró la mayor concentración de artemisinina, a pleno sol el más bajo y en el secado al sol, pero protegidas por las bolsas de papel se produjeron valores intermedios.^{59,64}

Sin embargo, se plantea que en un estudio similar realizado en Australia, Tasmania, con plantas enteras que se expusieron para su secado a los efectos del sol directo o a la sombra, o las hojas fueron removidas y luego secadas en horno a temperatura de 35 °C inmediatamente después de la cosecha, en este caso la temperatura máxima del aire fue de 22 °C, no se produjeron diferencias en la concentración de artemisinina o en la del ácido artemisinico entre cualquiera de estos tratamientos. La explicación para las diferencias entre estos dos estudios pudiera ser la temperatura máxima del aire, que fue de 30 °C para el primer experimento y de 22 °C en el segundo.²

Aun cuando el secado al sol sería más económico, se requiere efectuar estudios en un rango de zonas climáticas, especialmente subtropicales, para confirmar sus efectos sobre estos compuestos; hasta el presente no hay datos disponibles acerca de su influencia sobre el ácido artemisinico en climas continentales o tropicales, así como tampoco sobre la respuesta que se origina cuando se realice el secado de las plantas enteras o el de hojas o el de separación de ramas.

En relación con el contenido de aceite esencial, se señala que al parecer colocar las plantas de *A. annua* en el sol para su secado no tiene efectos perjudiciales sobre este constituyente, por lo que sería otro incentivo para tratar de obtener más datos del secado al sol sobre el ácido artemisinico, por las posibilidades del doble propósito de obtención de esos dos productos en la explotación comercial de esta planta.⁶⁵

Respecto al secado artificial, el que pudiera ser una necesidad indispensable en algunos lugares donde se cultive *A. annua*, la información que se brinda es que se han encontrado suficientes ejemplos en la literatura con resultados detallados; se hace alusión a que en un estudio realizado por Charles y otros (1992) que no fue publicado, sobre el secado en un horno forzado en abanico a temperaturas de 30,

50 y 80 °C en comparación con el secado al sol y a la sombra, los resultados demostraron que en el secado al horno se disminuyó la artemisinina en comparación con el de la sombra, pero con tal variación que sugiere realizar estudios adecuadamente garantizados.²

Puede haber situaciones en que el costo del secado y la reducción de artemisinina sean aceptables, la respuesta a esto dependerá del costo particular de la estructura en la región de producción. El costo de producción de *A. annua*, tanto en lo referente al cultivo como lo relacionado con el procesamiento poscosecha, cambian grandemente con la región y el método de producción utilizado. De cualquier forma, una necesidad obvia y vital para hacer rentable la producción de drogas antipalúdicas para el productor y costeable para el usuario final, es la disponibilidad de líneas de *A. annua* con alto contenido de artemisinina y(o) de ácido artemisinico que sea adaptable a la región donde se vaya a producir.

En relación con los requerimientos básicos para la comercialización de la materia prima de hojas de *A. annua* según la *Farmacopea de la República Popular China* de 2000, se exige como características organolépticas color amarillento a verde oscuro, hojas que crujen con olor característico y sabor ligeramente amargo; como características físico-químicas el contenido de humedad no debe exceder de 12 %, el de impurezas, ramas, materias orgánica igual o menor que 3 %, el contenido de artemisinina mayor o igual que 0,5 % y la materia prima debe estar libre de tierra y moho.⁶⁶

En cuanto a su envasado, plantea que se debe usar material degradable, limpio, no dañado, resistente a golpe y que se correspondan con los requisitos de calidad para drogas vegetales. Respecto al almacenamiento, se refiere que en lo posible se envíe directamente al fabricante para la extracción de la artemisinina, porque su contenido puede decrecer con el almacenaje a temperaturas altas debido al grupo peroxide que existe en la estructura química de la artemisinina, la cual se oxida con el calor; por eso es que se recomienda que el tiempo de almacenaje máximo de las hojas debe ser de 6 meses, pasado este período debe ser valorado de nuevo el contenido de artemisinina, porque puede perder su valor terapéutico después de 1 año de almacenamiento. Las condiciones deben ser aireadas, ambiente seco, protegidos de la luz, con equipos para controlar la humedad y protegidas contra insectos y roedores.⁶⁶

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados mostrados en las diversas investigaciones realizadas con diferentes líneas de *A. annua* de distintas localidades permite enfatizar que:

- En cuanto a las semillas utilizadas se requiere seleccionar aquellas que proporcionen adecuadas características agronómicas (vigorosas, de hojas grandes, resistencia a las enfermedades y momento de floración deseable) y alta producción de artemisinina.
- Para el cultivo de esta planta se recomienda hacer semilleros y luego trasplantar cuando las posturas alcancen alrededor de 15 cm, aproximadamente 2 meses después de establecer el semillero.
- Entre los aspectos agrícolas, la densidad de población es fundamental para la planta y es un aspecto vital en su cultivo, porque para algunos las altas densidades entre 22 y 25 plantas/m² resultan las más convenientes, en tanto que otros obtienen resultados satisfactorios con densidades de alrededor de 10 plantas/m².
- La fecha de siembra está en dependencia a la línea de *A. annua* y su adaptación

al ambiente donde se va a cultivar, de esta manera se señala que en aquellas adaptadas al ambiente tropical, su cultivo se realice entre diciembre y enero, y corresponderá a la etapa vegetativa, antes del inicio de la botonación en junio, el momento de cosecha del material vegetal que proporciona máximo rendimiento de hojas con alta concentración de artemisinina; en tanto que en clima templado fresco se prefiere su cultivo en primavera (octubre-noviembre) y en clima continental final de primavera-inicios del verano con los mejores resultados cuando se cosecha en plena floración.

— En relación con el papel que desempeñan los fertilizantes en el cultivo de *A. annua*, por los estudios realizados en maceta y campo analizados en esta reseña, se puede inferir que el nitrógeno constituye un elemento fundamental, porque proporciona incrementos en los rendimientos de materia seca de hojas y de artemisinina.

— Como en las hojas y las flores de *A. annua* es donde están concentrados fundamentalmente los principios activos, la técnica ideal de cosecha sería alguna forma de separación mecánica de estos componentes de la planta que permita eliminar el gran volumen de tallo principal, porque del rendimiento total de masa cosechada en estado vegetativo se ha determinado que corresponde solo a hojas 26,9 %, mientras que cuando se cosecha en floración es de 29 % de hojas y 17 % de flores.

— Para esta planta es fundamental su mejoramiento genético, por lo que se requiere escoger un programa donde se pueda predecir y estimar la heredabilidad del contenido del principio activo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tang W, Eisenbrand G. Chinese drugs of plants origin. Chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine. Berlin: Springer-Verlag; 1992. p. 159-74.
2. Laughlin JC, Heazlewood GN, Beatlie BB. Cultivation of *Artemisia annua* L. En: Wright CW, editor. Artemisia. London: Taylor and Francis; 2002. p. 159-96.
3. Ferreira JF, Simon JE, Janick J. *Artemisia annua*: Botany, Horticulture, Pharmacology. Horticultural Reviews. 1997; 19: 319-71.
4. Delabays N, Benakis A, Collet G. Selection and breeding for high artemisinin (Qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua* L. Acta Hort. 1993;330:203-7.
5. Debrunner N, Dvorak V, Magalhaes P, Delabays N. Selection of genotypes of *Artemisia annua* L. for the agricultural production of artemisinin. En: Pank F, editor. Proceedings of an International Symposium: Breeding Research in Medicinal and Aromatic Plants, June 30th - 4 July. Germany: Quedlinburg; 1996. p. 222-5.
6. Pras NJ, Visser JE, Batterman S, Woerdenbag HJ, Malingre TM, Lugt CB. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. for high artemisinin yielding types. Phytochem Anal. 1991;2:80-3.
7. Singh AV, Kaul VK, Mahajan, VP, Singh A, Misra LN, Thakur RS, et al. Introduction of *Artemisia annua* in India and isolation of artemisinin a promising antimalarial drug. Indian J Pharm Sci. 1986;48:137-8.

8. Singh AV, Vishwakarma RA, Husain A. Evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. *Planta Med.* 1988;54:475-6.
9. Simon JE, Ceibert E. *Artemisia annua*: A production guide. En: Simon JE, Clavio LZ, editors. Third National Herb Growing and Marketing Conference. *Sta Bull: Purdue Univ. Agr Exp*; 1988. p. 552.
10. Simon JE, Charles D, Ceibert E, Grant L, Janick J, Whipkey A. *Artemisia annua* L: A promising aromatic and medicinal. En: Janick J, Simon JE, editors. *Advances in New Crops.*, Oregon: Timber Press; 1990. p. 522-6.
11. Morales MR, Charles DJ, Simon JE. Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Acta Hort.* 1993;344:416-20.
12. Ferreira JF, Simon JE, Janick J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Med.* 1995;61:167-70.
13. Woerdenbag HJ, Lugt CB, Pras N. *Artemisia annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. *Pharm Weekbl.* 1990;12:169-81.
14. Delabays N, Blanc C, Collet G. La culture et la selection d' *Artemisia annua* en vue de la production d' artemisinine. *Revue Suisse Vitic Arboric Hort.* 1992;24:245-51.
15. Laughlin JC. Effect of agronomic practices on plant yield and antimalarial constituent of *Artemisia annua*. *Acta Hort.* 1993;331:53-61.
16. Laughlin JC. Agricultural production of artemisinin-A review. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88(Suppl. I):21-2.
17. Laughlin JC. The influence of distribution of antimalarial constituents in *Artemisia annua* L. on time and method of harvest. *Acta Hort.* 1995;390:67-73.
18. Magalhaes PM de. A experimentacao agricola com plantas medicinais e aromaticas. *Atualidades Cientificas.* 1994;3:31-56.
19. Kawamoto H, Sekine H, Furuya T. Production of artemisinin and related sesquiterpenes in Japanese *Artemisia annua* during a vegetation period. *Planta Med.* 1999;65:88-9.
20. Delabays N. The selection of *Artemisia annua* L. and the genetics of its artemisinin (qinghaosu) content. Conthey: Proceedings of the Second MCdiplant Conference, May 14-15; 1992. p. 41-50.
21. Chatterjee SK. Introduction and domestication of new crops. Recommendations from workshop of the first world congress on medicinal and aromatic plants for human welfare: WOCMAP I I; 1993 jul 19-25; Maastricht, Netherlands. *Act Hort.* 1992;331:16.
22. World Health Organization (WHO). Revised draft: WHO model monograph on good agricultural and collection practice (GACP) of *Artemisia annua* L. Genova, Suiza: WHO; 2005.

23. Liersch R, Soicke C, Stehr C, Tiillner HV. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Med.* 1986;52:387-90.
24. Woerdenbag HJ, Pras N, Chan NG, Bang BT, Bos R, Van Uden W, et al. Artemisinin, related sesquiterpenes and essential oil in *Artemisia annua* during one vegetation period in Vietnam. *Planta Med.* 1994;60:272-5.
25. Chan KL, Teo CKH, Jinadasa S, Yuen KH. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. *Planta Med.* 1995;61:285-7.
26. Magalhaes PM de, Delabays N. The selection of *Artemisia annua* L. for cultivation in intertropical regions. Quedlinburg, Germany : Proceedings of an International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, June 30 - July 4; 1996; p. 185-8.
27. Magalhaes PM de, Raharinaivo J, Delabays N. Influences de la dose et du type d'azote sur la production en artemisinine de l'*Artemisia annua* L. *Rev Suisse Viticulture, Arboriculture Horticulture.* 1996;28(6):349-53.
28. Charles DJ, Simon JE, Wood KV, Heinstejn P. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. *J Nat Products.* 1990;53:157-60.
29. Bagchi GD, Ram M, Sharma S, Kumar S. Effect of planting date on growth and development of *Artemisia annua* under subtropical climatic conditions. *J Med Aromatic Plant Sciences.* 1997;19(2):387-94.
30. Maynard L. Malaria Cure. Pharmacy Report. The University of Mississippi School of Pharmacy. 1985;7(1):10-3.
31. World Health Organization (WHO). The development of artemisinin and its derivatives. World Health Organization mimeographed document WHOITDRICHEMAL ART. 86.3. Genova, Suiza: WHO; 1988.
32. Ram M, Gupta M, Naqvi A, Kumar S. Effect of planting time on the yield of essential oil and artemisinin in *Artemisia annua* under subtropical conditions. *J Essent Oil Res.* 1997;9(1):193-7.
33. Muni R, Gupta M, Dwivedi S, Kumar S. Effect of density on the yields of artemisinin and essential oil in *Artemisia annua* cropped under low input cost management in North-Central India. *Rev Planta Medica.* 1997;63(4):372-4.
34. Chung B. Effect of plant population density and rectangularity on the growth and yield of poppies (*Papaver somniferum*). *J Agric Sci.* 1990;115:239-45.
35. Srivastava NK, Sharma S. Influence of micronutrient imbalance on growth and artemisinin content in *Artemisia annua*. *Indian J Pharm Sci.* 1990;52:225-7.
36. Figueira GM. Mineralition, production and artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Acta Hort.* 1996;426:573-7.
37. Ferreira JF. Nutrient deficiency in the production of artemisinin, dihydroartemisinic acid and artemisinic acid in *Artemisia annua* L. *Rev J Agric Food Chem.* 2007;55(5):1686-94.

38. Khanna KR, Shukla S. Genetics of secondary plant products and breeding for their improved content and modified quality. In: Biochemical aspects of crop improvement, Khanna KR, editor, Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 283-323.
39. Elhag HM, El-Domiaty MM, El-Feraly FS, Mossa JS, El-Olemy MM. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. *Phytother Res.* 1992;6:20-4.
40. Ghan KL, Teo CKH, Jinadasa S, Yuen KH. Selection of high artemisinin yielding *Artemisia annua*. *Planta Med.* 1995;61(3):285-7.
41. Delabays N, Darbelly Ch, Galland N. The variation and heredability of *Artemisia annua* L. En: Wright CW, editor. *Artemisia*. London: Taylor & Francis; 2002.
42. Mueller MS, Karhagomba IB, Hirt HM, Wernakoor E, Li SM, Heide L. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J Ethnopharmacol.* 2000;73:487-93.
43. Mukherjee T. Antimalarial herbal drugs. A review. *Fitoterapia.* 1991;62:197-204.
44. Carvalho JE, Dias PC, Foglio MA. *Artemisia*. *Rev Racine.* 1997;36:56-7.
45. Magalhaes PM de, Delabays N, Sartoratto A. New hybrid lines of antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil. *Cien Cult.* 1997;49:413-5.
46. Magalhaes PM de, Debruner N, Sartoratto A, Oliveira J de. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. *Acta Hortic.* 1999;502:377-81.
47. El-Feraly FS, Al-Meshal IA, Al-Yahya MA, Hifnawy MS. On the possible role of qinghao acid in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry.* 1986;25:2772-8.
48. Jung MH, ElSohly N, McChesney JD. Artemisinic acid; a versatile chiral synthon and bioprecursor to natural products. *Planta Med.* 1990;56:624.
49. Sangran RS, Agarwal K, Luthra R, Thakur RS, Singh-Sangwan N. Biotransformation of arteannuic acid into arteannuin-B and artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry.* 1993;34:1301-2.
50. Kim NC, Kim SU. Biosynthesis of artemisinin from 11,12-dihydroarteannuic acid. *J Korean Agr Chem Soc.* 1992;35:106-9.
51. Wallaart E, Van Uden W, Pras N. Possible biosynthetic pathway of artemisinin in a Chinese *Artemisia annua* strain. *Proceeding of the Symposium on Plant Cell, Tissue and Organ Cultures in Liquid Media.* Prague, 8-11 juillet; 1994. p. 171-2.
52. Hu SL, Xu ZL, Pan JG, Hou YM. The glandular trichomes of *Artemisia annua* L. and their secretions. *J Res Educ Indian Med.* 1993;12:9-15.
53. Duke MV, Paul RN, El-Sohly HN, Sturtz G, Duke SD. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissue of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *Int J Plant Sci.* 1994;155:365-72.

54. Ferreira JF, Janick J. Floral morphology of *Artemisia annua* to trichomes. Int J Plant Sci. 1995;156(6):807-15.
55. Wallaart TE, Van Uden W, Lubberdink HGM, Woerdenbag HJ, Pras N, Quax WJ. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its possible role in the biosynthesis of artemisinin. J Nut Prod. 1999;62;430-3.
56. Bryson CT, Croom EM. Herbicide inputs for a new agronomic crop, annual wormwood (*Artemisia annua*). Weed Technol. 1991;5:117-24.
57. Laughlin JC, Munro D. The effect of Sclerotinia stem in infection on morphine production and distribution in poppy (*Papaver somniferum* L.) plants. J Agric Sci Cambridge. 1983;100:299-303.
58. Elhag H, Abdel-Sattar E, El-Domiaty M, El-Olemy M, Mosa JS. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. Part 11. Follow up of the performance of micropropagated clones. Arab Gulf J Scientific Research. 1997;15(3):683-93.
59. Charles DJ, Simon JE, Shock CC, Feibert EB, Smith RM. Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. En: Janick J, Simon JE, editors. New York: Wiley; 1993. p. 640-2.
60. Ferreira JFS, Simon JE, Janick J. Relationship of artemisinin content of tissue-cultured, greenhouse-grown, and field-grown plants of *Artemisia annua*. Planta Med. 1995;61:351-5.
61. Ferreira JF, Janick J. Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua*. Acta Hort. 1995;390:41-9.
62. Ferreira JF, Janick J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. En: Janick J, Simon JE, editors. USA: Proceedings of the Third National New Crops Symposium. Indianapolis; 1995;3:578-84.
63. Ferreira JF, Charles D, Simon JE, Janick J. Effect of drying methods on the recovery and yield of artemisinin from *Artemisia annua* L. Hort Science. 1992;27:650 (Abstr. 565).
64. Feibert E. Sweet wormwood (*Artemisia annua*) research at Ontario. Hort Science. 1994;29(5):557 (Abstr. 683).
65. Charles DJ, Cebert E, Simon JE. Characterization of the essential oil of *Artemisia annua* L. J Ess Oil Res. 1991;3:33-9.
66. The Peoples Republic of China Pharmacopoeia. Vol. 1. Beijing: Chemical Industry Press; 2000.

Recibido: 30 de mayo de 2009.
Aprobado: 30 de mayo de 2010.

Dra. C. *Lérida Acosta de la Luz*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Estación Experimental de Plantas Medicinales «Dr. Juan Tomás Roig». Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: lerida@infomed.sld.cu