

DETECCIÓN IN-VITRO DE INHIBIDORES DE LA ACETILCOLINESTERASA EN EXTRACTOS DE CUARENTA PLANTAS DE LA FLORA COLOMBIANA MEDIANTE EL MÉTODO CROMATOGRÁFICO DE ELLMAN

RESUMEN

En la búsqueda de plantas como fuente potencial de fitocompuestos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se normalizó el método cromatográfico de Ellman, con extractos metanólicos y de diclorometano de 40 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumari (PRNU).

La verdadera actividad inhibitoria sobre AChE fue observada en los extractos metanólicos de las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae: *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, *Solanum sp.*, *Solanum deflexiflorum* Bitter, *Solanum leucocarpum* Dunal y en el extracto de diclorometano de la última planta, los cuales presentaron halos de inhibición significativos de la AChE en el ensayo por cromatografía de capa delgada (CCD). los mismos extractos fueron positivos frente al revelador de Dragendorff, sugiriendo que estos inhibidores pueden ser de naturaleza alcaloidal. También, se detectaron por CCD aldehídos y aminas los cuales se consideraron como falsos-positivos en el ensayo de inhibición de la AChE.

PALABRAS CLAVES: Asteraceae, bioprospección, biodiversidad química, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Rubiaceae, Solanaceae.

ABSTRACT:

In the search of plants as potential source of inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) the Ellman chromatographic method was standardized, to determine the inhibitory activity against the AChE of methanolic and dichloromethane extracts from 40 plants collected in the Natural Regional Park Ucumari (PRNU).

*The true inhibitory activity on the acetylcholinesterase was observed in the methanolic extracts of the plants belonging to the family Solanaceae: *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, *Solanum sp.*, *Solanum leucocarpum* Dunal, *Solanum deflexiflorum* Bitter and the dichloromethane extract of *Solanum leucocarpum* Dunal which presented inhibition spots on the AChE in thin layer chromatography (TLC) assay. These extracts were also positive against the Dragendorff reagent, suggesting that the acetylcholinesterase inhibitors (AChE) can be of alkaloidal origin. In addition, thin layer chromatography allowed to detect aldehydes and amines like false-positive in the AChE inhibition assay.*

KEYWORDS: Asteraceae, bioprospection, chemical biodiversity, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Rubiaceae, Solanaceae.

1. INTRODUCCION

La enzima acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) es una proteína tetramérica, cuyo sitio activo incluye un grupo hidroxilo que realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo de la acetilcolina, desarrollando una transición tetrahédrica y el producto es la acetilación de

El sitio activo de la AChE contiene una tríada catalizadora que consiste en Ser 200, His 440 y Glu 327, la cual es similar a la tripsina y otras proteasas de serina. Sin embargo, la tríada de la AChE tiene la

OSCAR M. MOSQUERA M

Químico, M. Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
omosquer@utp.edu.co

JAIME NIÑO

Lic. Bga.-Qca., M. Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

YANED MILENA CORREA

Química
Profesora Catedrática
Universidad Tecnológica de Pereira
yamico@utp.edu.co

JIMMY ALEXANDER HERNÁNDEZ

Estudiante
Programa de Tecnología Química

Grupo De Investigación Biotecnología – Productos Naturales

la serina y la liberación de colina [14]. Esta enzima regula la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en ácido acético y colina [7].

estereoquímica opuesta a la de tripsina y contiene Glu en lugar de Asp de la tripsina. La AChE es una de las enzimas más eficaces ya que hidroliza 5000 moléculas de ACh /molécula de enzima/s [8].

De acuerdo con Keane y Ryan, [7] las colinesterasas del reino animal, están clasificadas según la especificidad del sustrato, como acetil (AChE), propionil (PChE) o butirilcolinesterasa (BuChE). Dentro de los vertebrados, la AChE y BuChE tienen el 50% de aminoácidos identificados y las estructuras terciarias globulares de la AChE y BuChE son muy similares [8].

Una de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) es contrarrestar el deterioro de la actividad colinérgica en el cerebro usando inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) [12], los cuales aunque no curan ni previenen la enfermedad, estabilizan la cantidad de acetilcolina (ACh) en la sinapsis de la corteza cerebral al impedir su hidrólisis. Es en este campo, donde las investigaciones han logrado los mayores avances terapéuticos en el tratamiento de la EA [19], [20].

Para la identificación de compuestos con actividad inhibitoria de la AChE se han utilizado los métodos: espectrofotométrico de Ellman [2], [13], [18]; el de HPLC en combinación con la detección bioquímica [5]; el de cromatografía en capa delgada (CCD) [14], [6] y también los fluorométricos [15]. Según Marston et al., [9] la actividad de la AChE también se puede detectar a través de CCD por la conversión del acetato de naftilo en α -naftol y su posterior reacción con la sal de diazonio azul rápido B (C.I. 37235) para formar una coloración púrpura.

De acuerdo a Rhee et al., [16] el método cromatográfico de Ellman permite determinar si la inhibición de la AChE se debe a verdaderos inhibidores o a falsos-positivos (aldehídos y/o aminas) presentes en los extractos vegetales o a la hidrólisis espontánea entre la Tiocolina y el DNTB.

Conociendo la riqueza de nuestra flora en el Parque Regional Natural Ucumari (PRNU), la cual tiene un gran potencial como fuente de metabolitos secundarios con actividades bactericida, antimicótica y citotóxica [10], [11] y a la necesidad de encontrar nuevos agentes terapéuticos contra esta enfermedad basados en los inhibidores de la acetilcolinesterasa, se propuso investigar los extractos de plantas del PRNU para evaluar su actividad como verdaderos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE); además, avanzar el conocimiento, valoración y utilización de la flora Colombiana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Material vegetal

El material vegetal correspondió a 40 especies de plantas pertenecientes a las familias Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Rubiaceae y Solanaceae recolectadas en diferentes zonas del PRNU. Un ejemplar de cada una de ellas fue clasificado taxonómicamente por el Dr. Francisco Javier Roldán del Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA) (Medellín – Colombia) y un voucher de cada una se encuentra en el HUA como se presenta en la tabla 1.

2.1.2 Reactivos

Se emplearon los solventes de grado analítico: acetona, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, metanol y *n*-hexano de las marcas Mallinckrodt, J.T Baker y Carlo Erba.

AChE (EC 3.1.1.7), Acido-5,5'- Ditiobis (2-nitrobenzoico) (DNTB) (Reactivo de Ellman), fisostigmina (Eserina) y galantamina fueron de la marca Sigma. El ioduro de acetiltiocolina (ATCI) fue marca Aldrich. Se utilizó buffer Base-Tris, Promega. Se emplearon cromatoplasmas en aluminio de sílica gel 60 F₂₅₄ de 20 x 20 con un espesor de 0.25 μ m; así como, los reveladores: ninhidrina (para aminas), 2,4-dinitrofenilhidracina (para aldehídos) y Dragendorff (para alcaloides) todos fueron Merck.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Extracción

El material vegetal recolectado fue secado en estufa a una temperatura de 50 °C, se separaron las hojas de las ramas, se molieron y se extrajeron sucesivamente por el método de lixiviación durante siete días, empleando como solventes: *n*-hexano, diclorometano y metanol, los cuales fueron concentrados en rotaevaporador a 50 °C hasta sequedad, marcados y almacenados a 4 °C hasta su utilización.

2.2.2 Caracterización de alcaloides por vía húmeda y CCD de los extractos de MeOH y CH₂Cl₂ de las 40 plantas analizadas.

La evaluación fitoquímica de los extractos crudos de diclorometano y metanol fue realizada por vía húmeda y por CCD en placas de vidrio de sílica gel.

Las pruebas fitoquímicas por vía húmeda, se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Dominguez [1]. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Familia	Nombre científico	Nº Voucher
Asteraceae	<i>Chromolaena tequendamensis</i> (Hieron) R.M. King y H. Rda.	3730
	<i>Liabum asclepiadeum</i> Sch. Bip	3720
	<i>Montanoa</i> sp	3749
	<i>Munnozia polymonioides</i> (D.C)	3716
	<i>Munnozia senecionides</i> Benth	3721
	<i>Schistocarpha sinforosi</i> Cuatrec	3725
	<i>Verbesina nudipes</i> Blake	3746
Euphorbiaceae	<i>Acalypha diversifolia</i> Jacq	3726
	<i>Acalypha macrostachya</i> Jacq	3738
	<i>Alchornea glandulosa</i> Poepp	3742
	<i>Alchornea grandiflora</i> Mull.Arg	3727
	<i>Croton magdalenensis</i> Mull	3736
	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	3734
	<i>Phyllanthus</i> sp	3715
	<i>Sapium stylare</i> Muell-Arg.Ext	3160
Melastomataceae	<i>Miconia</i> sp	3739
	<i>Miconia aeruginosa</i> Naudin	3741
	<i>Miconia quintuplinervia</i> Cong	3743
Rubiaceae	<i>Cinchona pubescens</i> Vahl	3161
	<i>Diocidendron dioicum</i> Steyem	3748
	<i>Gonzalagunia rosea</i> Standl	3731
	<i>Hoffmannia asperula</i> Standl	3169
	<i>Palicourea andaluciana</i> Standl	3183
	<i>Palicourea petrolaris</i> Wemh	3182
Solanaceae	<i>Browallia speciosa</i> Hosk	3732
	<i>Cestrum olivaceum</i> Francey	3159
	<i>Deprea glabra</i> (Standl) A.T	3722
	<i>Lycianthes acutifolia</i> (R y P)	3156
	<i>Lycianthes radiata</i> (Sendt)	3154
	<i>Lycianthes</i> sp	3735
	<i>Lycianthes synanthera</i> (Sendt)	3719
	<i>Solanum</i> sp	3173
	<i>Solanum sycophanta</i> Dunal	3737
	<i>Solanum ovalifolium</i> Dunal	3714
	<i>Solanum leucocarpum</i> Dunal	3717
	<i>Solanum deflexiflorum</i> Bitter	3718
	<i>Solanum aphyodendron</i> S. Knapp	3729
	<i>Solanum lepidotum</i> Dunal	3728
<i>Solanum stellatiglandulosum</i> Bitter	3744	
<i>Witheringia coccoloboides</i> (Damn) Hunz	3155	

Tabla 1. Plantas recolectadas en el PRNU y utilizadas para detectar su actividad como inhibidores de la acetilcolinesterasa

Para las CCD, cada muestra se sembró a una concentración de 5000 ppm y fueron desarrolladas con el eluyente CHCl₃-AcOEt-MeOH (2:2:1) y posteriormente fueron reveladas con reactivos específicos, siguiendo el procedimiento propuesto por Rhee et al., [16] y Stahl, [21].

2.2.3 Determinación de inhibidores de la acetilcolinesterasa (IACHe) por Cromatografía de Capa Delgada (CCD)

La determinación de IACHe en los extractos vegetales, se realizó mediante el método cromatográfico de Ellman de

capa delgada según la metodología descrita por Rhee et al., [14] y Salles et al., [18].

Las cromatoplasmas se realizaron como se describió en 2.2.2 y posteriormente fueron reveladas con el reactivo de Ellman (solución de 1mM ATCI, 1 mM de DNTB). Luego fueron secadas a temperatura ambiente y seguidamente reveladas con una solución de AChE 3 U/mL. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa se mostraron como manchas blancas en el fondo amarillo de las placas cromatográficas. Para este bioensayo se utilizaron como control positivo galantamina (4×10^{-3} M) y fisostigmina (1×10^{-5} M).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de alcaloides por vía húmeda y CCD de los extractos de MeOH y CH_2Cl_2 de las 40 plantas analizadas.

La marcha fitoquímica por vía húmeda y por CCD, determinaron que los extractos metanólicos de las plantas evaluadas en éste trabajo presentaron alcaloides y el 81.25 % de las especies de la familia Solanaceae presentaron la mayor proporción de estos metabolitos, lo cual corrobora lo expuesto por Galeano y Bernal, [3] y García, [4] con relación a la presencia de alcaloides en esta familia.

3.2 Cromatografía de Capa Delgada (CCD) para detectar IChE en extractos de metanol y diclorometano

En la figura 1, se observa el cromatograma de los extractos de metanol y diclorometano de las plantas que presentaron inhibición de la AChE. Además, se puede observar que las únicas especies que presentaron más de un halo de inhibición frente a la enzima AChE fueron las muestras No 1 (*Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz) y la muestra No 13 (*Solanum leucocarpum* Dunal); por lo cual, se puede inferir que en estas plantas puede haber más de un compuesto IChE.

Con el fin de examinar si la actividad inhibitoria de la AChE presentada por los extractos (ver Figura 1) se debía a la presencia de alcaloides, estos se evaluaron por CCD utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff, como se observa en la figura 2.

De acuerdo con la figura 2, los extractos metanólicos de las especies: *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz (1), *Solanum sp* (3), *Solanum leucocarpum* Dunal (5), *Solanum deflexiflorum* Bitter (6) y el extracto de diclorometano de *Solanum leucocarpum* Dunal (8) presentaron alcaloides.

De acuerdo con los resultados de los falsos-positivos (Datos no mostrados) y a los presentados en las figuras 1

y 2, se puede inferir que la verdadera actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa fue presentada por los extractos metanólicos de las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae: *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, *Solanum sp*, *Solanum leucocarpum* Dunal, *Solanum deflexiflorum* Bitter y el extracto de diclorometano de *Solanum leucocarpum* Dunal. Dicha actividad es debida fundamentalmente a la presencia de alcaloides, como fue reportado por Roddick, [17] para la solanidina y solasodina, alcaloides ampliamente distribuidos en la familia Solanaceae.

Ingkaninan et al., [6] en la evaluación de plantas de Tailandia con actividad inhibitoria para la AChE a través de CCD, encontraron que los extractos metanólicos fueron los de mayor actividad y que su verdadera actividad se debía a la presencia de alcaloides.

Se deduce también que los extractos metanólicos de las plantas pertenecientes a la familia Asteraceae evaluadas en este trabajo no ejercieron una actividad inhibitoria verdadera de la AChE debido a la detección de aldehídos en los extractos de esta familia botánica. Salles et al., [18], reportaron que el extracto de *Verbeina diversifolia* (Asteraceae) a una concentración de 1600 ppm no ejerció actividad inhibitoria sobre la AChE, lo cual corrobora los resultados obtenidos, en este trabajo.

Hasta donde se ha podido consultar, las plantas utilizadas en esta investigación no han sido evaluadas previamente como fuente de IChE; por lo tanto, los extractos analizados pueden tener importancia en la búsqueda de IChE y los trabajos con estas plantas promisorias como verdaderos IChE deben continuar.

4. CONCLUSIONES

Se determinó a través de cromatografía de capa delgada (CCD) que los extractos metanólicos de las plantas: *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, *Solanum sp*, *Solanum leucocarpum* Dunal, *Solanum deflexiflorum* Bitter y el extracto de diclorometano de *Solanum leucocarpum* Dunal, ejercen verdadera actividad inhibitoria sobre la AChE y que esta puede deberse fundamentalmente a la presencia de alcaloides.

Se encontró que la familia Solanaceae presentó la mayor actividad inhibitoria de la AChE en los dos tipos de extractos evaluados, siendo más efectivos los metanólicos (4/16) frente a los de diclorometano (1/16).

Se evidenció que la flora del Parque Regional Natural Ucumari (PRNU) es una fuente potencialmente importante de fitocompuestos con actividad inhibitoria de la AChE.

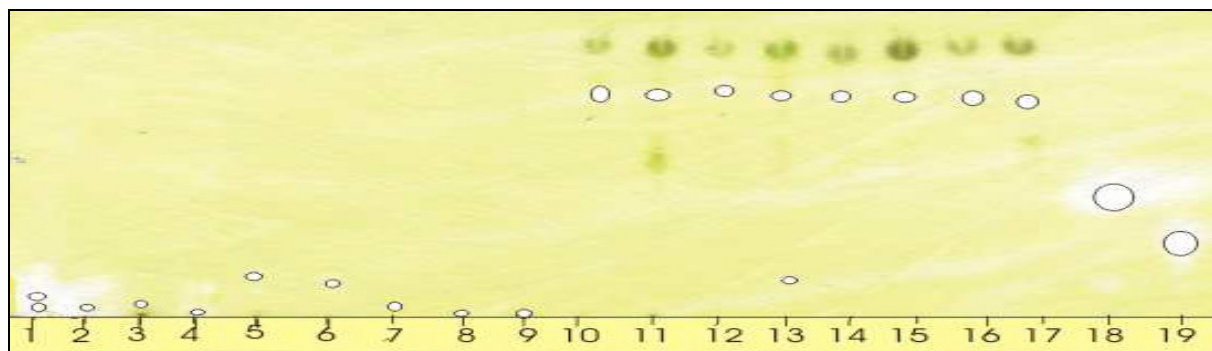


Figura 1. CCD de los extractos de metanol y diclorometano inhibidores de la AChE. Los puntos blancos en círculo sobre el fondo gris indican inhibición de la AChE. Los extractos evaluados en la cromatopla de izquierda a derecha fueron: **Extractos metanólicos:** 1. *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, 2. *Cestrum olivaceum*, 3. *Solanum sp.*, 4. *Munnozia polymonioides* (D.C), 5. *Solanum leucocarpum* Dunal, 6. *Solanum deflexiflorum* Bitter, 7. *Deprea glabra* (Standl) A.T, 8. *Schistocarpha sinforosi* Cuatrec, 9. *Chromolaena tequendamensis* (Hieron) R.M. King y H. Rda. **Extractos de diclorometano:** 10. *Lycianthes radiata* (Sendt), 11. *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, 12. *Cestrum olivaceum*, 13. *Solanum leucocarpum* Dunal, 14. *Munnozia senecionides* Benth, 15. *Solanum lepidotum* Dunal, 16. *Diocidendron dioicum* Steyem, 17. *Montanoa sp.*, 18. Fisostigmina 1×10^{-5} M. 19. Galantamina 4×10^{-3} M.

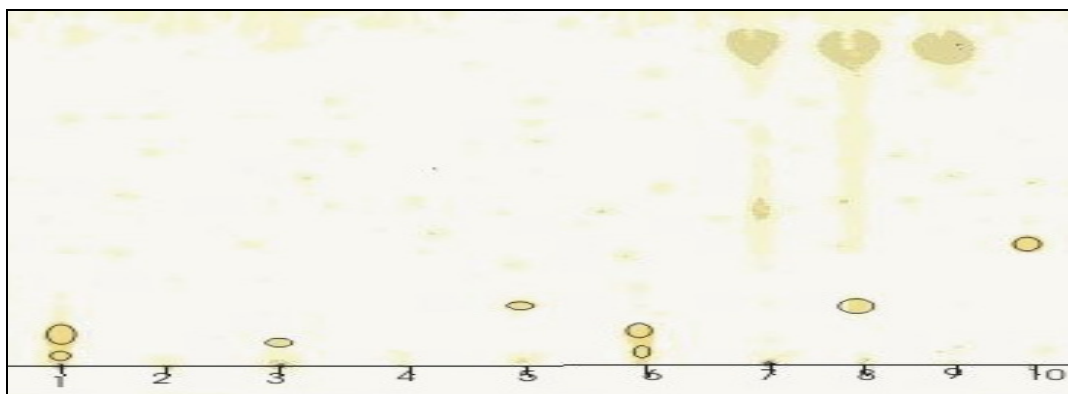


Figura 2. Cromatografía de Capa Delgada de extractos de metanol y diclorometano inhibidores de la AChE usando el revelador de Dragendorff. Los puntos oscuros en círculo sobre el fondo blanco indica la presencia de alcaloides. Los extractos evaluados en la placa de izquierda a derecha fueron, **Extractos metanólicos:** 1. *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, 2. *Cestrum olivaceum*, 3. *Solanum sp.*, 4. *Munnozia polymonioides* (D.C), 5. *Solanum leucocarpum* Dunal, 6. *Solanum deflexiflorum* Bitter. **Extractos de diclorometano:** 7. *Witheringia coccoloboides* (Damn) Hunz, 8. *Solanum leucocarpum* Dunal, 9. *Solanum lepidotum* Dunal, 10. Fisostigmina 1×10^{-5} M.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] DOMÍNGUEZ, X:A (1985). Métodos de Investigación Fitoquímica. Primera edición, 281 páginas, Limusa, México.
- [2] ELLMAN, G., COURTNEY, D., ANDIES, V. AND FEATHERSTONE, R.. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.

- [3] GALEANO, M.P. Y BERNAL, R.G. (1993). Guía de las plantas del Parque Regional Natural Ucumarí. CARDER, Tomos I, II.
- [4] GARCÍA, H. (1992). Flora medicinal de Colombia. Ed Talleres del Tercer mundo editores. Tomos I páginas 559, Tomo II páginas 537, Tomo III páginas 507, Santa fe de Bogota Colombia.
- [5] INGKANINAN, K., BEST, C. M., VAN DER HEIJDEN, R., HOFTE, A. J. P., KARABATAK, B., IRTH, H., TJADEN, U.R., VAN DER GREEF, J. AND VERPOORTE, R. (2000). High-

- performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A*. 872: 61-73.
- [6] INGKANINAN K., TEMKITTHAWON, P., CHUENCHOM, K., YUYAEM, T. AND THONGNOI, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89: 261- 264.
- [7] KEANE, S. AND RYAN, M. F. (1999). Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria Mellonella*. *Insect Biochemistry and molecular Biology*. 29: 1097-1104.
- [8] KRAUT, D., GOFF, H., PAI, R. K., HOSEA, N. A., SILMAN, I., SUSSMAN, J. J., TAYLOR, P. AND VOET, J. G. (2000). Inactivation studies of acetylcholinesterase with phenylmethylsulfonyl fluoride. *Molecular Pharmacology*. 57: 1243-1248.
- [9] MARSTON, A., KISSLING, I. AND HOSTETTMANN, K. (2002). A rapid TLC bioautography method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*. 13: 51- 54.
- [10] NIÑO, J., MOSQUERA, O. M., CORREA, Y. M., VICTORIA, P. A. Y ESPINAL, C. M. (2002). Evaluación preliminar de la actividad biológica y tamizados fitoquímicos de cincuenta plantas del Parque Regional Natural Ucumari. *Scientia et Technica*, VIII (19): 151-157.
- [11] NIÑO, J., ESPINAL, C. M. MOSQUERA, O. M., AND CORREA, Y. M. (2003). Antimycotic activity of 20 plants from Colombian flora. *Pharmaceutical Biology*. 41(7): 491 – 496.
- [12] PERRY, E.K. (1986). The cholinergic hypothesis ten years on. *Br. Med. Bull.* 42: 63 – 69.
- [13] PERRY, N. S. L., HOUGHTON, P. J., THEOBALD, A., JENNER P. AND PERRY, E. K. (2000). In-vitro inhibition of human erythrocytes acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal Pharmacology*. 52: 895-902.
- [14] RHEE, I.K., VAN DE MEENT, M., INGKANINAN, K. AND VERPOORTE, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bio-activity staining. *Journal of Chromatography A*. 915: 217- 223.
- [15] RHEE, I.K., APPELS, N., LUIJENDIJK, T., IRTH, H. AND VERPOORTE, R. (2003a). Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plants extracts using a fluorometric flow assay. *Phytochemical Analysis*. 14: 145-149.
- [16] RHEE, I.K., VAN RIJIN, R. M. AND VERPOORTE, R. (2003b). Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*. 14: 127-131.
- [17] RODDICK, J.G. (1989). The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *Phytochemistry*. 28: 2631 – 2634.
- [18] SALLES, M.T., VIANA, F. V., VAN DE MEENT, M., RHEE, I.K. AND VERPOORTE, R. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from plants to treat Alzheimer disease. *Quimica Nova*. 26: 1-7.
- [19] SINGH, A.P. (2003). The role of natural products in pharmacotherapy of Alzheimer disease. *Ethnobotanical Leaflets*. 7: 1-5.
- [20] SRAMEK, J. J., ZAROTSKY, V. AND CUTLER, N. R. (2002). Review of drug development and therapeutic role of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Drug Development Research*. 56: 347-353.
- [21] STAHL, E. AND SCHORN, P.J. (1969). Aromatic and heterocyclic amines. En: STAHL, E. (Ed). *Thin layer chromatography. A laboratory Handbook*. Segunda edición. Springer-Verlag. Berlín. P 500-506.

6. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Pereira por la financiación parcial del trabajo de grado: E9-04-4 de JAHB. A la CARDER por permitir la recolección del material vegetal en el Parque Regional Natural Ucumari (PRNU).