

Estimation of secondary compounds in *Tithonia diversifolia* from the regrowth age and primary metabolites

Estimación de compuestos secundarios en *Tithonia diversifolia* a partir de la edad de rebrote y metabolitos primarios

M. Silva-Déley¹, Blanca M. Toro-Molina¹, D. M. Verdecia-Acosta⁴, E. Chacón-Marcheco¹, J. A. Roca Cedeño³, J. L. Ledea-Rodríguez³, J. L. Ramírez-De la Ribera² and R. S. Herrera⁵

¹Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Técnica de Cotopaxi, Cantón Latacunga, El Ejido, Sector San Felipe, Ecuador

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Apartado Postal 21, Bayamo, CP. 85 100, Granma, Cuba.

³Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Carrera de Medicina Veterinaria, Calceta-Manabí-Ecuador

⁴Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) km 5.5. CP 23080. La Paz, Baja California Sur, México

⁵Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Email: dverdeciaacosta@gmail.com

M. Silva-Déley: <https://orcid.org/0000-0002-6660-8102>

Blanca M. Toro-Molina: <https://orcid.org/0000-0003-3772-5200>

D.M. Verdecia-Acosta: <https://orcid.org/0000-0002-4505-4438>

E. Chacón-Marcheco: <https://orcid.org/0000-0001-9590-6451>

J. A. Roca-Cedeño: <https://orcid.org/0000-0001-9065-7126>

J. L. Ledea-Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0001-5195-1496>

J. L. Ramírez-De la Ribera: <https://orcid.org/0000-0002-0956-0245>

R.S. Herrera: <https://orcid.org/0000-0003-1424-6311>

With the objective of determine the effect of regrowth age and the content of primary metabolites (nitrogen, fructose, glucose and sucrose) on the estimation of secondary metabolites in *Tithonia diversifolia* this study was develop following a random block design with three treatments (60, 120 and 180 days) and six repetitions. For the estimation of this compounds the content of nitrogen (N), glucose (Glu), fructose (Frut), sucrose (Suc) and the plant maturity (age) was evaluated. For the validation the difference between the observed and estimated values was established as well as the relation of them and the variability. For the relation between both values (observed and estimated) when this one is near to unit (1) and to the variability (VC). During the rainy where there were relations between estimated and observed values between 0.84 and 1.39, as well as variation coefficients between 0.01-13 %; the highest values for VC at 60 days were found in total condensed tannins, raffinose and flavonoids (6.96, 8.63 and 8.17 %), 120 days free condensed tannins and saponins (10.88 and 10.18 %), during the dry season the relation values of 0.96 to 1.07 for the studied metabolites, except for verbascose, alkaloids and total steroids which were away from the unit (1) with 0.64, 0.76 and 1.44, respectively. So, it is showed that the estimation of secondary metabolites from the multiple regression lineal models in both seasons of the year, they can be applied as result that regardless to the different criteria that exits about the biochemical paths for the synthesis of them, their precursors will be the primary metabolites because of the dependence of the content of nitrogen, glucose, fructose and sucrose, age and plant phenology.

Key words: *sugars, mathematical model, nitrogen, estimation, validation*

Con el objetivo de determinar el efecto de la edad de rebrote y contenido de metabolitos primarios (nitrógeno, fructosa, glucosa y sacarosa) en la estimación de los compuestos secundarios en *Tithonia diversifolia*, se desarrolló el presente estudio, siguiendo un diseño en bloques al azar, con tres tratamientos (60, 120 y 180 días) y seis repeticiones. Se evaluó para la estimación de estos compuestos el contenido de nitrógeno (N), glucosa (Glu), fructosa (Frut) y sacarosa (Sac) y la madurez de la planta (edad). Para la validación se estableció la diferencia entre los valores observados y estimados, así como la relación de estos y la variabilidad. Para la relación entre ambos valores (observado y estimado), cuando esta se acerca a la unidad (1) y la variabilidad (CV). Durante la lluvia donde se encontraron relaciones entre valores estimados y observados entre 0.84 y 1.39, así como coeficientes de variación entre 0.01-13 %; los mayores valores para CV a los 60 días se encontraron en taninos condensados totales, rafinosa y Flavonoides. (6.96, 8.63 y 8.17 %), 120 días taninos condensados libres y saponinas (10.88 y 10.18 %), durante la poca lluvia los valores de relación de 0.96 a 1.07 para los metabolitos estudiados, excepto para verbascosa, alcaloidesaloides y esteroides totales que estuvieron más alejados de la unidad (1) con 0.64, 0.76 y 1.44, respectivamente. Por lo que, quedó evidenciado que la estimación de los metabolitos secundarios a partir de los modelos de regresión lineal múltiples en ambos períodos del año, pueden ser aplicados debido a que independiente de los diferentes criterios que existen sobre los senderos bioquímicos para las síntesis de estos, sus precursores serán los metabolitos primarios por la dependencia del contenido de nitrógeno, glucosa, fructosa y sacarosa, edad y fenología de planta.

Palabras clave: *azúcares, modelos matemáticos, nitrógeno, estimación, validación*

Due to the own characteristics of tropical grasses, which has low digestible protein levels and a high fiber rate, the foliage of the shrubs it has been

Debido a las características propias de los pastos tropicales, que poseen bajos niveles de proteína digestible y alta tasa de fibra, el follaje de las especies arbustivas

considered, in many cases, as a nutritional strategy in the ruminants supplementation in the tropic, with the purpose on improvement the productive and alimentary level of animals, mainly during the lack of forage periods (Verdecia *et al.* 2020). In this sense *Tithonia diversifolia* is one of the non legumes plants considered as promising for their use in the feeding of different animal's species (Rivera *et al.* 2018) and it use has been increasing in the last years (Li *et al.* 2020).

It is important to taking into account an element that in certain circumstance can constitutes a limitation in the use of these resources and it is the presence of secondary metabolites. During millions of years most of this species of plants has been survived thanks to their ability for producing substances that will protect them of their predatory. Even when some of these compound (condensed tannins, phenols, alkaloids, oligosaccharides and saponins) are able to produce a violent and immediate reaction, in most of the cases has a refine effect which is show with the prolonged ingestion (Li *et al.* 2020).

Secondary compounds as tannins, phenols, flavonoids and alkaloids constitutes defense mechanisms against the pathogen microorganisms and the predation by insects or herbivorous. Also, they are important in the interaction of the plant with its environment, when attracting organisms that pollinate and disperse the seeds (Isah 2019). These ones, however, affect the metabolic processes of the animal and the growth rate of some microorganisms after their intake (Guillén-Andrade *et al.* 2019). In accordance with Martín (2017) and Isah (2019), the presence and concentration of these compounds can vary between species due to the effects of the biotic (Herrera *et al.* 2020) and abiotics factors, aspects which favor decrease of the photosynthetic activity of the plant and as a result the levels of the carbohydrates (glucose, fructose and sucrose) decreased and they are move for the production of secondary metabolites; as well as, the nitrogenous nutrients are also destined to the synthesis of more complex substances coming from the plant secondary metabolism as defense mechanism (Verdecia *et al.* 2021).

So, it is important to know the effect of the regrowth age and content of primary metabolites (nitrogen, fructose, glucose and sucrose) on the estimation of secondary metabolites in *Tithonia diversifolia*.

Materials and methods

Research area, climate and soil. The study was developed in areas from the Departamento Docente-Productivo de la Universidad de Granma, which is located in the southeast of Cuba, in Granma province, at 17.5 km from Bayamo city. Studies during two years were performed (2014-2015), and two seasons were considered, the rainy (May-October) and dry

y/o arbóreas se ha considerado, en muchos casos, como una estrategia nutricional en la suplementación de los rumiantes en el trópico, con el fin de mejorar el nivel productivo y alimentario de los animales, principalmente durante los períodos de escasez de forraje (Verdecia *et al.* 2020). En este sentido *Tithonia diversifolia* es una de las plantas no leguminosas considerada como promisoría para su empleo en la alimentación de diferentes especies animales (Rivera *et al.* 2018) y su uso ha ido en aumento en los últimos años (Li *et al.* 2020).

Es importante tener en cuenta un elemento que en cierta medida puede constituir una limitante en el uso de estos recursos y es la presencia de metabolitos secundarios. Durante millones de años muchas de estas especies de plantas han sobrevivido gracias a su capacidad para producir sustancias que las protejan de sus depredadores. Aun cuando algunos de estos compuestos (taninos condensados, fenoles, alcaloidesaloides, oligosacáridos y saponinas) son capaces de producir una reacción violenta e inmediata, en la mayoría de los casos tienen un efecto sutil que se manifiesta con la ingestión prolongada (Li *et al.* 2020).

Compuestos secundarios como taninos, fenoles, flavonoides y alcaloides constituyen mecanismos de defensa contra la presencia de microorganismos patógenos y la depredación por insectos o herbívoros. Además, son importantes en la interacción de la planta con su entorno, al atraer organismos que polinizan y dispersan las semillas (Isah 2019). Estos, no obstante, afectan los procesos metabólicos del animal y/o la tasa de crecimiento de algunos microorganismos después de su ingestión (Guillén-Andrade *et al.* 2019). De acuerdo con Martín (2017) e Isah (2019), la presencia y concentración de estos compuestos puede variar entre especies debido a los efectos de los factores bióticos (Herrera *et al.* 2020) y abióticos, aspectos que propician disminución de la actividad fotosintética de la planta y por consiguiente decrecen los niveles de los carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa) y estos son movilizados para la producción de metabolitos secundarios; así como, los nutrimentos nitrogenados también son destinados a la síntesis de sustancias más complejas provenientes del metabolismo secundario vegetal como mecanismo de defensa (Verdecia *et al.* 2021).

Por lo que, sería importante conocer el efecto de la edad de rebrote y contenido de metabolitos primarios (nitrógeno, fructosa, glucosa y sacarosa) en la estimación de los compuestos secundarios en *Tithonia diversifolia*.

Materiales y Métodos

Área de investigación, clima y suelo. El estudio se desarrolló en áreas del Departamento Docente-Productivo de la Universidad de Granma, que se encuentra al sureste de Cuba, en la provincia de Granma, a 17.5 km de la ciudad de Bayamo. Se realizaron estudios durante dos años (2014-2015), y se consideraron dos períodos, el lluvioso (mayo-octubre) y poco lluvioso (noviembre-abril).

(November-April).

The soil was calcic haptustep (Soil Survey Staff 2014), with pH of 6.2. The content of P_2O_5 , K_2O and total N was 2.4, 33.42 and 3 mg/100g of soil, respectively, with 3.6 % of organic matter.

During the rainy season, the rainfalls were of 731.4 mm; the average, minimum and maximum temperature registered values of 26.73, 22.31 and 33.92 °C, respectively and the average, minimum and maximum relative humidity was 80.78, 51.02 and 96.22 %, respectively. In the dry season, the rainfalls reached values of 270 mm; the temperature was 24.05, 18.29 and 31.58 °C for the average, minimum and maximum, respectively and the minimum, average and maximum relative humidity with averages of 76.21, 44.16 and 97.03 %, values which corresponded with the historical mean for the region.

Treatment and experimental design. A random block design with four replications (plots) was used for taken the samples and the regrowth ages 60, 120 and 180 days were considered as treatments.

Procedures. For the established specie (*T. diversifolia*) at the beginning of each seasonal period a homogeneity cut was made at 15 cm above the soil. The samplings in each plot (0.0282 ha) were carried out taking 10 plants row eliminating the first one and the last one to avoid border effect in an area of 0.5. The sample was homogenized and later weighed manually separating leaves, petioles and stems, these latter with diameter less than 2cm considered as edible biomass. Later 1kg for each of the treatments was taken for the laboratory analysis. During the experimental stage irrigation and fertilization was not applied.

Chemical analysis. The samples were dried at room temperature in a dark and ventilated room for 12 days. Then they were milled 30 g for each repetition to a 1mm particle size. They were stored in amber bottles at room temperature until their analysis.

It was determined: Nitrogen (N) in accordance with the AOAC (2016), while the contents of glucose, fructose and sucrose according to the titration method of Lane and Eynon, which is based on the reduction of Cu^{+2} to Cu^{+1} by the reducing sugars, using as indicator methylene blue (AOAC 2016).

Models for the estimation of secondary metabolites. For the estimation of secondary metabolites, the multiple linear regression models obtained by Verdecia (2014) (tables 1 and 2) were considered, as a way to validate the functioning of them, from the obtained results (of primary metabolites) at the ages of 60, 120 and 180 days previously described in chemical analysis. Those multiple regression equations are following showed where the age and nitrogen, glucose, fructose and sucrose are related in both seasons of the year.

For the validation of these models the Giraldo *et al.* (1998) criteria were followed. For which the difference between observed and estimated values were established,

El suelo presente en el área fue calcoide sic haptustep (Soil Survey Staff 2014), con pH de 6.2. El contenido de P_2O_5 , K_2O y N total fue de 2.4, 33.42 y 3 mg/100g de suelo respectivamente, con 3.6 % de materia orgánica.

Durante la época de lluvia, las precipitaciones fueron de 731.4 mm; la temperatura media, mínima y máxima registró valores de 26.73, 22.31 y 33.92 °C, respectivamente y la humedad relativa fue de 80.78, 51.02 y 96.22 %, para la media, mínima y máxima, respectivamente. En el período de pocas lluvias, las precipitaciones alcaloidesanzaron valores de 270 mm; la temperatura fue de 24.05, 18.29 y 31.58 °C para la media, mínima y máxima, respectivamente y la humedad relativa mínima, media y máxima con promedios de 76.21, 44.16 y 97.03 %, valores que se corresponden con la media histórica para la región.

Tratamiento y diseño experimental. Para la toma de muestras se empleó un diseño en bloques al azar con cuatro réplicas (parcelas), considerándose como tratamientos las edades de rebrote de 60, 120 y 180 días.

Procedimientos. Para la especie ya establecida (*T. diversifolia*) al inicio de cada período estacional se realizó un corte de homogeneidad a 15 cm de altura del suelo. Los muestreos en cada parcela (0.0282 ha) se realizaron tomando 10 plantas al hilo eliminando la primera y la última para evitar el efecto de borde en un área de 0.5. La muestra se homogenizó y pesó posteriormente separando de forma manual hojas, peciolo y tallos, estos últimos con diámetro inferior a 2 cm considerado como biomasa comestible. Luego se tomó 1 kg por cada uno de los tratamientos para los análisis en el laboratorio. Durante la etapa experimental no se aplicó riego ni fertilización.

Análisis químico. Las muestras se secaron a temperatura ambiente en un local oscuro y ventilado durante 12 días. Con posterioridad se molinaron 300 g para cada repetición hasta tamaño de partícula de un milímetro. Se almacenaron en frascos de color ámbar a temperatura ambiente hasta su análisis.

Se determinó: Nitrógeno (N) de acuerdo con la AOAC (2016), mientras que los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa según el método de titulación de Lane y Eynon, el cual se fundamenta en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} por los azúcares reductores, empleando como indicador azul de metileno (AOAC 2016).

Modelos para la estimación de los metabolitos secundarios. Para la estimación de los metabolitos secundarios se consideraron los modelos de regresión lineal múltiples obtenidos por Verdecia (2014) (tablas 1 y 2), como forma de validar el funcionamiento de los mismo, para lo que partió de los resultados obtenidos (de los metabolitos primarios) a las edades de 60, 120 y 180 días descritos anteriormente en análisis químico. Dichas ecuaciones de regresión múltiple se muestran a continuación donde se relacionan la edad y nitrógeno, glucosa, fructosa y sacarosa en ambos períodos del año:

Para la validación de estos modelos se siguieron los criterios de Giraldo *et al.* (1998). Para lo cual se estableció la diferencia entre los valores observados y

Table 1. Multiple linear regression equations for *Tithonia diversifolia* in the dry season

Metabolites	Models	R ²	Significance of the model
Total phenols	17.91-0.03(age)-703.28(fructose)	0.99	P<0.001
Total tannins	10.513-0.019(age)-626.99(glucose)	0.99	P<0.001
Total condensed tannins	33.2-0.06(age)-0.35(nitrogen)	0.81	P<0.0001
Total bound tannins	8.18+0.01(age)+197.12(fructose)	0.99	P<0.0001
Free condensed tannins	0.67+0.01(age)+0.06(nitrogen)-84.97(fructose)	0.99	P<0.0001
Stachyose	0.0015+0.000009(age)+0.21(fructose)	0.99	P<0.0001
Raffinose	0.02-0.00005(age)+3.35(fructose)-1.47(sucrose)	0.99	P<0.0001
Flavonoids	12.78+0.18(age)-0.27(nitrogen)	0.99	P<0.0001
Saponins	-0.17+0.01(age)+53.28(fructose)	0.99	P<0.0001
Alkaloids	0.57+0.0026(age)+4.16(fructose)	0.99	P<0.0001
Triterpenes	6.54+0.01(age)-73.89(glucose)	0.99	P<0.0001
Total steroids	4.32+0.05(age)	0.99	P<0.0001

Table 2. Multiple linear regression equations for *Tithonia diversifolia* in the dry season

Metabolites	Models	R ²	Sig. model
Total phenols	4.77+0.01(age)	0.98	P<0.001
Total condensed tannins	8.88+0.02(age)	0.90	P<0.001
Total bound condensed tannins	6.76+0.01(age)+162.30(glucose)	0.99	P<0.001
Free condensed tannins	-3.08+0.019(age)+543.39(glucose)-85.07(fructose)	0.99	P<0.001
Verbascose	0.01-0.000032(age)	0.94	P<0.001
Flavonoids	21.83+0.19(age)-0.37(nitrogen)	0.99	P<0.001
Saponins	1.25+0.01(age)	0.85	P<0.001
Alkaloids	1.30+0.0016(age)-0.01(nitrogen)-45.82(glucose)	0.99	P<0.001
Triterpenes	-0.73+0.04(age)+0.06(nitrogen)+279.72(glucose)	0.99	P<0.001
Total steroids	5.01+0.055(age)	0.99	P<0.001

as well as the relation of these ones and the variability. For the relation between both values (observed and estimated), when these one is near to the unit (1) and the variability (VC) is within the normal ranges (16) the model prediction is correct.

Statistical analysis and calculation. Kolmogorov-Smirnov tests were performed for the normal distribution of data (Massey 1951), homogeneity of variances (Bartlett 1937). The statistical program SPSS version 22 was used.

Results

In table 3 are showed the results of the validation models for the content of secondary metabolites for *Tithonia diversifolia* during the rainy season where relations between estimated and observed values between 0.84 and 1.39 were found; as well as variation coefficients between 0.01-13 %; the highest values for VC at 60 days were found in total condensed tannins, raffinose and flavonoids (6.96, 8.63 and 8.17 %), 120 days Phenols condensed total and saponins (10.88 and 10.18 %) and 180 days phenols condensed tannins, raffinose and saponins (7.09, 12.37 and 9.03 %), respectively.

estimados, así como la relación de estos y la variabilidad. Para la relación entre ambos valores (observado y estimado), cuando esta se acerca a la unidad (1) y la variabilidad (CV) está dentro de los rangos normales (16) la predicción del modelo es correcta.

Análisis estadístico y cálculos. Se realizaron pruebas Kolmogorov-Smirnov para la distribución normal de los datos (Massey 1951), homogeneidad de las varianzas (Bartlett 1937). Para lo que se empleó el programa estadístico SPSS versión 22.

Resultados

En la tabla 3 se muestran los resultados de la validación de los modelos para el contenido de metabolitos secundarios para la *Tithonia diversifolia* durante el período lluvioso donde se encontraron relaciones entre valores estimados y observados entre 0.84 y 1.39; así como coeficientes de variación entre 0.01-13 %; los mayores valores para CV a los 60 días se encontraron en taninos condensados totales, rafinosa y flavonoides (6.96, 8.63 y 8.17 %), 120 días taninos condensados libres y saponinas (10.88 y 10.18 %) y 180 días taninos condensados libres, rafinosa y saponinas (7.09, 12.37 y 9.03 %), respectivamente.

Table 3. Estimation of secondary metabolites of *Tithonia diversifolia* during the rainy season from multiple linear regression models

Metabolites	60				120				180			
	Observed	Estimated	Relation Est/Obs	VC, %	Observed	Estimated	Relation Est/Obs	VC, %	Observed	Estimated	Relation Est/Obs	VC, %
TF	6.20	6.16	0.99	0.46	12.38	12.55	1.01	0.96	7.58	7.87	1.04	2.65
TT	0.56	0.78	1.39	3.21	5.36	5.34	0.996	0.26	3.17	3.22	1.02	1.11
TCT	14.29	15.77	1.10	6.96	13.66	15.01	1.10	6.66	14.56	13.17	0.90	7.09
TBCT	11.37	11.57	1.02	1.23	9.54	9.87	1.03	2.40	10.79	11.28	1.05	3.14
FCT	2.92	2.44	0.84	2.66	4.13	3.54	0.86	10.88	3.77	3.49	0.93	5.45
Stac	0.005	0.0051	1.02	1.40	0.0032	0.0031	0.97	2.24	0.0046	0.0045	0.98	1.55
Raf	0.02	0.0226	1.13	8.63	0.0096	0.0119	1.24	5.13	0.012	0.0143	1.19	12.37
Fla	11.50	12.91	1.12	8.17	24.43	25.90	1.06	4.13	38.39	38.06	0.99	0.61
Sap	1.26	1.18	0.94	4.64	1.34	1.16	0.87	10.18	2.25	1.98	0.88	9.03
Alk	0.79	0.78	0.99	0.90	0.90	0.89	0.99	0.79	1.07	1.06	0.99	0.66
Trit	6.24	6.13	0.98	1.26	7.68	7.40	0.96	2.63	8.30	7.78	0.94	4.57
ST	7.46	7.32	0.98	1.34	10.70	10.32	0.96	2.56	13.80	13.32	0.97	2.50

TF: Total phenols; TT: Total tannins; TCT: Total condensed tannins; TBCT: Total bound condensed tannins; FCT: Free condensed tannins; Stac: Stachyose; Raf: Raffinose; Fla: Flavonoids; Sap: Saponines; Alk: Alkaloids; Trit: Triterpenes; ST: Total steroids

Table 4. Estimation of secondary metabolites of *Tithonia diversifolia* during the dry season from multiple linear regression models

Metabolites	60			120			180					
	Observed	Estimated	Relation Est/Obs	VC, %	Observed	Estimated	Relation Est/Obs	VC, %	Observed	Estimated	Relation Est/Obs	VC, %
TF	5.36	5.37	1.00	0.13	5.82	5.97	1.03	1.80	6.47	6.57	1.02	1.08
TT	10.46	10.08	0.96	2.62	11.05	11.28	1.02	1.46	13.13	12.48	0.95	3.59
TCT	8.77	8.53	0.97	1.96	9.35	8.87	0.95	3.73	10.13	9.41	0.93	5.21
TBCT	1.69	1.65	0.98	1.69	1.70	1.66	0.98	1.68	3.00	2.94	0.98	1.43
FCT	0.0071	0.0081	1.14	9.30	0.0043	0.0062	1.44	5.59	0.0032	0.0042	1.31	9.11
Stac	15.68	16.05	1.02	1.65	28.55	29.14	1.02	1.45	44.71	45.29	1.01	0.91
Raf	1.66	1.85	1.11	7.66	1.87	2.45	1.31	8.99	2.37	3.05	1.29	7.74
Fla	0.79	0.60	0.76	9.33	0.99	0.82	0.83	3.28	1.19	1.06	0.89	8.17
Sap	6.31	6.47	1.03	1.77	7.78	8.16	1.05	3.37	9.05	9.67	1.07	4.68
Alk	8.28	5.34	0.64	10.52	11.73	5.67	0.48	9.25	14.90	11.00	0.40	6.22
Trit	6.24	6.13	0.98	1.26	7.68	7.40	0.96	2.63	8.30	7.78	0.94	4.57
ST	7.46	7.32	0.98	1.34	10.70	10.32	0.96	2.56	13.80	13.32	0.97	2.50

TF: Total phenols; TT: Total tannins; TCT: Total condensed tannins; TBCT: Total bound condensed tannins; FCT: Free condensed tannins; Stac: Stachyose; Raf: Raffinose; Fla: Flavonoids; Sap: Saponins; Alk: Alkaloids; Trit: Triterpenes; ST: Total steroids

During the dry season (table 4) values of relation from 0.96 to 1.07 were obtained for the studied metabolites, except for verbascose, alkaloids and total steroids which were more away from the unit (1) with 0.64; 0.76 and 1.44, respectively. While, the variability was between 0.13 to 4.00 %, although for verbascose, saponine, alkaloid and steroid total were between 6 and 10 %, with the highest differences between the estimated and observed values in verbascose and the steroids of 0.0016 and 3.9 g kg⁻¹.

Durante el período poco lluvioso (tabla 4) se obtuvieron valores de relación de 0,96 a 1,07 para los metabolitos estudiados, excepto para verbascosa, alcaloides y esteroides totales que estuvieron más alejados de la unidad (1) con 0.64; 0.76 y 1.44, respectivamente. Mientras que, la variabilidad estuvo entre 0.13 a 4.00 %, aunque para verbascosa, saponinas, alcaloides y esteroides totales estuvieron entre 6 y 10 %, con las mayores diferencias entre los valores estimados y observados en verbascosa y los esteroides de 0.0016 y 3.9 g kg⁻¹.

Discussion

There are evidences that with the use of adequate mathematical methods can save time and resources to calculate or predict certain variables. So, Herrera and Hernández (1986) predicted the grass digestibility from their chemical constituents and Ramírez (2010) the digestibility of five tropical grasses from the structural and soluble components. Likewise, Verdecia (2014) used the age and primary components for his prediction and Estrada-Jiménez *et al.* (2023) by artificial intelligence used regression algorithms.

Verdecia (2014) pointed out that the plants used a significant amount of the absorbed carbon, nitrogen and the energy to the synthesis of a wide varieties of organic molecules that didn't seem to have a direct function in photosynthetic and respiratory process, nutrients assimilation, solute transport or synthesis of proteins, carbohydrates or lipids, and they named secondary metabolites and to the variability of these ones with the age.

Lineal multiple regression equations were established where the dependent variable were the secondary metabolites and the independent variable consisted on the age, nitrogen, glucose, fructose and sucrose. For the selection of the better expression and its goodness of fit were taking into account the criteria Keviste *et al.* (2002), Guerra *et al.* (2003) and Torres and Ortiz (2005) related with high value of the determination coefficient (R^2), high signification of the expression and its indicators, low standard errors of the expression and its indicators, residues analysis and test of concordance between the observed and estimated values.

That is why for *T. diversifolia* (table1) in the rainy season there was not fit for the Verbascose, while in the dry season (table 2) the stachyose, raffinose and total tannins didn't has fit in their models, the rest of metabolites has values of R^2 higher than 0.85 and the total phenols, total bound condensed tannins, free condensed tannins, flavonoids, alkaloids, triterpenes and total steroids were highlighted with values of 0.99.

The biosynthetic ways of the secondary metabolites of the plants is a topic that powerfully calls the attention. The synthesis of each compound tend to be restricted to specific states of the development of each organism, specialized cells and stress period caused by the lack of nutrients or by the attack of microorganisms. This phenomenon is due to the formation, dependent of phase, of the specific enzyme and their activity, which mean that the expression of the secondary metabolite is based on a differentiation process (Lozano and Pichón 2018 and Cruz 2019).

From collateral ways to the photosynthesis, the plants synthesized the secondary metabolites (Sieiro Miranda *et al.* 2020), which has non nutritional functions, but very important for their survival. They are compounds

Discusión

Existen evidencias que con el empleo de adecuados métodos matemáticos se pueden ahorrar tiempo y recursos para calcular o predecir determinadas variables. Así, Herrera y Hernández (1986) predijeron la digestibilidad del pasto a partir de sus constituyentes químicos y Ramírez (2010) predijo la digestibilidad de cinco gramíneas tropicales a partir de los componentes solubles y estructurales. Asimismo, Verdecia (2014) empleó la edad y compuestos primarios para su predicción y Estrada-Jiménez *et al.* (2023) mediante inteligencia artificial emplearon algoritmos de regresión.

Verdecia (2014) señaló que las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado, nitrógeno y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios y la variabilidad de estos con la edad

Se establecieron ecuaciones de regresión múltiple lineal donde la variable dependiente fueron los metabolitos secundarios y las variables independientes consistieron en la edad, nitrógeno, glucosa, fructosa y sacarosa. Para la elección de la mejor expresión y su bondad de ajuste se tuvieron en cuenta los criterios de Keviste *et al.* (2002), Guerra *et al.* (2003) y Torres y Ortiz (2005) relacionados con el alto valor del coeficiente de determinación (R^2), alta significación de la expresión y sus parámetros, bajos errores estándar de la expresión y sus parámetros, análisis de residuos y prueba de concordancia entre los valores observados y estimados.

De ahí que para la *T. diversifolia* (tablas 1) en el período lluvioso no se encontró ajuste para la verbascosa, mientras que en el poco lluvioso (tabla 2) la estaquiosa, rafinosa y taninos totales no presentaron ajustes sus modelos, los demás metabolitos mantuvieron valores de R^2 mayores de 0.85 y se destacaron los fenoles totales, taninos condensados libres, taninos condensados libres, flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides totales con valores de 0.99.

Las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios de las plantas es un tema que llama poderosamente la atención. La síntesis de cada compuesto suele estar restringida a estados específicos del desarrollo de cada organismo, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos. Este fenómeno se debe a la formación, dependiente de fase, de la enzima específica y su actividad, lo que significa que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación (Lozano y Pichón 2018 y Cruz 2019).

A partir de vías colaterales a la fotosíntesis, las plantas sintetizan los metabolitos secundarios (Sieiro Miranda *et al.* 2020), los cuales tienen funciones no nutricionales, pero muy importantes para su supervivencia. Son compuestos que le sirven para protegerse de los factores

that are used to protect from external factors, in which are the flavonoides, tannins, lignans, coumarins, alkaloides, terpenes and saponins, among others. They are stored in some organelles of the cell. For example, the flavonoides, which are synthesized in the chloroplast and are transported to the endoplasmic reticulum and to the vacuoles (García Parra *et al.* 2018).

On the other hand, according to Verdecia *et al.* (2021) reports there is a close relation between the carbohydrates composition, age and the N content, on the secondary metabolites content. In accordance with this study, in addition of these ones, the conditions of soil and climate can determine the composition of some compounds, particularly the α -galactosides. The content of sucrose and verbascose could be genetically determined, while those of raffinose and stachyose depend, in less extension, of the environmental conditions, and mainly of the photosynthetic activity of the plants and the production of secondary metabolites.

Taking the relation of the secondary compounds with the age and the content of their precursors metabolites (nitrogen, glucose, fructose and sucrose). It is important to estimate from the models obtained by Verdecia (2014) for establishing of a low cost and precise system, since, for the determination of secondary metabolites and sugars is require advanced technology equipments and reagents with certain chemical specification which make possible that their analysis will be difficult and limit the number of samples that can be performed. The country and in special the eastern region didn't have the sufficient analytical basic for the quantification of the secondary metabolites, which is limited by the lack of material resources and financial availability to obtain them.

It could be studied other expressions, but the main objective was to determined by found models of relatively simplicity, easy to interpret and it was not of difficult management and interpretation by the technicians, specialists, researcher up to small and medium farmers and farmers.

It is of state that the models (tables 1 and 2) were specifics for each plant in each seasonal period and there was not uniformity in the amount of primary metabolites that integrate each expression and there was always significant effect of the age.

These models reaffirm the previous principles and showed that is necessary to develop future researchers which take into account guarantee these results in other edaphoclimatic conditions and in other species, as well as to develop researchers that allow to deep and to complement the obtained results. Hence that the results showed in tables 3 and 4 about the estimation from the models showed the close relation between the precursor metabolites (nitrogen, glucose, fructose and sucrose) and the age on the different secondary metabolites, since only the verbascose and steroids in

externos, en los que aparecen los flavonoides, taninos, lignanos, cumarinas, alcaloides, terpenos y saponinas, entre otros. Estos se almacenan en varios orgánulos de las células. Por ejemplo, los flavonoides, que se sintetizan en los cloroplastos y se transportan hacia el retículo endoplasmático y a las vacuolas (García Parra *et al.* 2018).

Por otro lado, según los reportes de Verdecia *et al.* (2021) existe una estrecha relación entre la composición de carbohidratos, la edad y el contenido de N, en el tenor de los metabolitos secundarios. De acuerdo con este estudio, además de estos, las condiciones de suelo y clima pueden determinar la composición de algunos compuestos, particularmente los α -galactósidos. El contenido de sacarosa y verbascosa pudieran estar genéticamente determinados, mientras que los de rafinosa y estaquiosa dependen, en menor extensión, de las condiciones ambientales, y fundamentalmente de la actividad fotosintéticas de las plantas y la producción de metabolitos primarios.

Partiendo de la relación de los compuestos secundarios estos con la edad y el contenido de sus metabolitos precursores (nitrógeno, glucosa, fructosa y sacarosa), sería de importancia estimar a partir de los modelos obtenidos por Verdecia (2014) para el establecimiento de un sistema preciso y de bajo costo, ya que, para la determinación de los metabolitos secundarios y azúcares se requiere de equipos de avanzada tecnología y reactivos con cierta especificación química que repercuten en que su análisis sea costoso y limite el número de muestras que se pueda realizar. El país y en especial la región oriental no disponen de la suficiente base analítica para la cuantificación de los metabolitos secundarios, lo cual se ve limitado por la escasez de recursos materiales y disponibilidad financiera para adquirirlos.

Se pudieron haber estudiado otras expresiones, pero el objetivo central estuvo determinado por encontrar modelos de relativa sencillez, fácil de interpretar y que no resultaran de difícil manejo e interpretación por parte del usuario desde técnicos, especialistas, investigador hasta pequeño y medianos productores y campesinos.

Es de señalar que los modelos (tablas 1 y 2) fueron específicos para cada planta en cada período estacional y no hubo uniformidad en la cantidad de metabolitos primarios que integran cada expresión y siempre hubo efecto significativo de la edad.

Estos modelos reafirman los principios enunciados con anterioridad e indicaron que es necesario desarrollar futuras investigaciones que tengan en cuenta avalar estos resultados en otras condiciones edafoclimáticas y en otras especies, así como desarrollar investigaciones que permitan profundizar y complementar los resultados aquí obtenidos. De ahí que los resultados expuestos en las tablas 3 y 4 sobre la estimación a partir de los modelos demuestren la estrecha relación entre los metabolitos precursores (nitrógeno, glucosa, fructosa y sacarosa) y la edad en los diferentes metabolitos secundarios, ya

T. diversifolia in the dry season, had not close relations to one which make difficult according to Giraldo *et al.* (1998) that the model prediction will be perfect.

The natural substances which are form in the plants are synthesized through many metabolic ways and are divided into primary and secondary metabolites, been these latter the most important regarding their applications in the nutrition and, animal and human health. The primary metabolites are considered essentials or precursors; they are nutritional molecules and can be used in the synthesis of compounds of high structural and chemical complexity. In this group are the soluble carbohydrates, proteins, lipids and nitrogenous compounds, among others (Wang *et al.* 2020).

In contrast to other organisms, the plants destined great amount of the assimilated carbon and of the energy to the synthesis of wide variety of organic molecules that seems not to have a direct relation with the photosynthetic process, respiratory process, nutrients assimilation and solutes transport, among others (Giménez *et al.* 2020).

These elements justify the reason for the primary metabolites (nitrogen, glucose, fructose and sucrose) were used in the predictions of secondary metabolites. The nitrogen is one of the elements of great importance in the yield and quality of plants because the influence on the synthesis of phenolic compounds. It has been showed that fertilization decreased these substances (Li *et al.* 2020) in early stages of the plant development (Cartera *et al.* 2011). These was reaffirm in *Labisia pumila* when increasing the fertilization from 0 to 270 g kg⁻¹ of N ha⁻¹ decreased the polyphenols (Ibrahim *et al.* 2011).

However, the clarification of the biosynthesis of phenolic compounds could provide the precise magnitude of the differences in the content of them between species and it tissues, and basically its ecological consequences and will evolve (Salminen and Karonen 2011). Although it cannot discount that the future knowing of genes which codify this process (Hichri *et al.* 2011) modified or clarified this variety of criteria.

Herlina *et al.* (2018) stated that the nitrogenous fertilization has effect on the alkaloids content. Optimums concentrations of this element stimulates the formation of vegetative organs and increase the alkaloids and flavonoids, while Herlina *et al.* (2019) showed that their high concentrations were found in fruits, roots, leaves and stems, in this order. However, recent studies Ryan *et al.* (2014) showed that this response is influence by the concentration of CO₂ in the environment.

For this, the relation C/N is frequently used as a general indicator of the levels of natural chemical protection of the plant against the impact of some biotic factors. The ingredients of the metabolism for the production of rich carbon substances are

que solo la verbascosa y esteroides en *T. diversifolia* en la poca lluvia, no hayan presentado relaciones cercanas a uno lo que dificulta según Giraldo *et al.* (1998) que la predicción del modelo sea perfecta.

Las sustancias naturales que se originan en las plantas se sintetizan a través de múltiples rutas metabólicas y se dividen en metabolitos primarios y secundarios, siendo estos últimos los más importantes en lo referente a sus aplicaciones en la nutrición y, salud animal y humana. Los metabolitos primarios se consideran esenciales o precursores, son moléculas nutricionales y pueden ser empleados en la síntesis de compuestos de mayor complejidad química y estructural. Dentro de este grupo se encuentran los carbohidratos solubles, las proteínas, los lípidos y los compuestos nitrogenados, entre otros (Wang *et al.* 2020).

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan gran cantidad del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una relación directa con los procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes y transporte de solutos, entre otros (Giménez *et al.* 2020).

Estos elementos justifican las razones por las cuales se emplearon los metabolitos primarios (nitrógeno, glucosa, fructuosa y sacarosa) en las predicciones de los metabolitos secundarios. El nitrógeno es uno de los elementos de mayor importancia en el rendimiento y calidad de las plantas ya que influyen en la síntesis de compuestos fenólicos. Se ha evidenciado que la fertilización disminuye estas sustancias (Li *et al.* 2020) en especial en estadios tempranos del desarrollo de la planta (Cartera *et al.* 2011). Esto se ratificó en *Labisia pumila* cuando al incrementar la fertilización de 0 hasta 270 g kg⁻¹ de N ha⁻¹ disminuyeron los polifenoles (Ibrahim *et al.* 2011).

Sin embargo, el esclarecimiento de la biosíntesis de los compuestos fenólicos pudiera proporcionar la magnitud precisa de las diferencias en el contenido de ellos entre especies y sus tejidos, y básicamente sus consecuencias ecológicas y evolucionaria (Salminen y Karonen 2011). Aunque no se puede descartar que el futuro conocimiento de los genes que codifican este proceso (Hichri *et al.* 2011) modifique o aclare esta diversidad de criterios.

Herlina *et al.* (2018) notificaron que la fertilización nitrogenada tiene efecto en el contenido de alcaloides. Concentraciones óptimas de este elemento estimulan la formación de órganos vegetativos y aumentan los alcaloides y flavonoides, mientras que Herlina *et al.* (2019) indicaron que sus mayores concentraciones se encontraron en frutos, raíces, hojas y tallos, por este orden. Sin embargo, otros estudios más recientes Ryan *et al.* (2014) evidenciaron que esa respuesta está influida por la concentración de CO₂ en el medio.

Por ello, la relación C/N se utiliza frecuentemente como un indicador general de los niveles de protección química natural de la planta contra el impacto de varios factores bióticos. Los ingredientes del metabolismo para la

associated to the increase of the synthesis of defensive compounds as phenols and terpenoids (Karolewski *et al.* 2010).

For the understanding of these results it was necessary to start with the collection of essential aspects related with the synthesis of secondary metabolites and some factors that influence, on their content due to the diversity of criteria that there are about these topics.

The performance of secondary metabolites in *T. diversifolia* according to Verdecia *et al.* (2021) is due to the characteristics of each species and the effects of the edaphoclimatic conditions in which the culture is developed. Herrera *et al.* (2017b) found in this plant between 0.43 and 2.6 g kg⁻¹ of total phenol and of 3.1 up to 4.9 g.kg⁻¹ of condensed tannins. While, Paumier *et al.* (2020) and Herrera *et al.* (2017a and 2020) reported of 6.4 to 8.7 g kg⁻¹ total phenols, although the triterpenes and total steroids were higher with 10.2 to 13.9 and of 25.4 to 29.2 g kg⁻¹ of dry matter, respectively.

In most of the cases these compounds have defensive functions and their concentrations depends on the nutritional and physiological status of the plant, and the proportion of phenolic compounds derived of the lignin which take part of the fibrous fraction (Cabrera-Carrión *et al.* 2017 and Hernández-Espinosa *et al.* 2020).

The results of the estimation of secondary metabolites from the age and precursor metabolites are similar to those obtained by Verdecia (2014) that when grouping different species of trees, shrubs and leguminous during the rainy and dry season the evaluated species in this research (*T. diversifolia*) showed the best results integrally with the lower concentrations of phytochemical compounds.

Conclusions

It was showed that the estimation of secondary metabolites from the multiple linear regression models in both season of the year, can be applied as result that independently of the different criteria about the biochemical pathways for the synthesis of these ones, their precursors will be the primary metabolites by the dependence on the content of nitrogen, glucose, fructose and sucrose, age and plant phenology.

Conflict of interest

The authors declare that there was not conflict among them.

Authors contribution

Lucia M. Silva-Déley: Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft

Blanca M. Toro-Molina: Conceptualization, Data curation, Methodology, Validation, Writing – original draft

D.M. Verdecia-Acosta: Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Investigation,

producción de sustancias ricas en carbono, están asociados al aumento de la síntesis de compuestos defensivos tales como fenoles y terpenoides (Karolewski *et al.* 2010).

Para la comprensión de estos resultados fue necesario comenzar con la recopilación de aspectos básicos relacionados con la síntesis de los metabolitos secundarios y algunos factores que influyen, además, en su contenido debido a la diversidad de criterios que existen sobre estos temas.

El comportamiento de los metabolitos secundarios en *T. diversifolia* se debe según Verdecia *et al.* (2021) a las características de cada especie y los efectos de las condiciones edafoclimáticas en las cuales se desarrolla el cultivo. Herrera *et al.* (2017b) encontraron en esta planta entre 0.43 y 2.6 g kg⁻¹ de fenoles totales y de 3.1 hasta 4.9 g.kg⁻¹ de taninos condensados, mientras que, Paumier *et al.* (2020) y Herrera *et al.* (2017a y 2020) informaron de 6.4 a 8.7 g kg⁻¹ fenoles totales, aunque los triterpenos y esteroides totales fueron superiores con 10.2 a 13.9 y de 25.4 a 29.2 g kg⁻¹ de materia seca, respectivamente.

En la mayoría de los casos estos compuestos presentan funciones defensivas y sus concentraciones dependen del estatus nutricional y fisiológico de la planta, y de la proporción de compuestos fenólicos derivados de la lignina que forman parte de la fracción fibrosa (Cabrera-Carrión *et al.* 2017 y Hernández-Espinosa *et al.* 2020).

Los resultados de la estimación de los metabolitos secundarios a partir de la edad y metabolitos precursores son similares a los obtenidos por Verdecia (2014) que al realizar el agrupamiento de diferentes especies árboles, arbustos y leguminosas tanto durante el período de lluvia como de poca lluvia la especie evaluada en esta investigación (*T. diversifolia*) presentó los mejores resultados de forma integral con las concentraciones más bajas de compuestos fitoquímicos.

Conclusiones

Quedó evidenciado que la estimación de los metabolitos secundarios a partir de los modelos de regresión lineal múltiples en ambos períodos del año, pueden ser aplicados debido a que independiente de los diferentes criterios que existen sobre los senderos bioquímicos para las síntesis de estos, sus precursores serán los metabolitos primarios por la dependencia del contenido de nitrógeno, glucosa, fructosa y sacarosa, edad y fenología de planta.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto entre ellos

Contribución de los autores

Lucia M. Silva-Déley: Conceptualización, Curación de datos, Adquisición de fondos, Metodología, Validación, Visualización, Escritura – documento original

B.M. Toro-Molina: Conceptualización, Curación de datos, Metodología, Validación, Escritura – documento

Methodology, Supervision, Writing – review & editing
E. Chacón-Marcheco: Investigation, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Validation, Visualization

J. A. Roca-Cedeño: Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Validation, Visualization, Writing – original draft

J. L. Ledea-Rodríguez: Data curation, Formal analysis, Writing – original draft, Funding acquisition, Validation, Visualization

J.L. Ramírez-de la Ribera: Conceptualization, Investigation, Data curation, Project administration, Supervision, Writing – review & editing

R.S. Herrera: Conceptualization, Investigation, Data curation, Methodology, Supervision, Writing – review & editing

original

D.M. Verdecia-Acosta: Conceptualización, Curación de datos, Adquisición de fondos, Investigación, Metodología, Supervisión, Escritura – revisión y edición

E. Chacón-Marcheco: Investigación, Curación de datos, Análisis formal, Adquisición de fondos, Validación, Visualización

J. A. Roca-Cedeño: Curación de datos, Análisis formal, Adquisición de fondos, Validación, Visualización, Escritura – documento original

J. L. Ledea-Rodríguez: Curación de datos, Análisis formal, Escritura – documento original, Adquisición de fondos, Validación, Visualización

J.L. Ramírez-de la Ribera: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Administración de proyectos, Supervisión, Escritura – revisión y edición

R.S. Herrera: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Metodología, Supervisión, Escritura – revisión y edición

References

- AOAC, G. W. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed., Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5, Available: <http://www.directtextbook.com/isbn/9780935584875>. [Consulted: September 22, 2016].
- Bartlett, M. 1937. "Properties of sufficiency and statistical tests". *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 160(2): 268–282, ISSN: 1471-2946. <http://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>.
- Cabrera-Carrión, J.L., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cun-Carrión, J., García, P.A. & Rojas-de Astudillo, L. 2017. "Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam en función de su edad y altura". *Bioagro*, 29(1): 53-60, ISSN: 1316-3361. <https://www.redalyc.org/pdf/857/85750098006.pdf>
- Cartera, M.E., Francisco, M., Soengas, P. & Velasco, P. 2011. "Phenolic compounds in Brassica vegetables". *Molecules*, 16(1): 251-280, ISSN: 1420-3049, <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>.
- Cruz, D.C. 2019. "Nitrógeno: ¿Elemento esencial? Importancia en la Química de los Productos Naturales". *Naturaleza y Tecnología*, 6(2): 1-6, ISSN: 2007-672X. http://repositorio.ugto.mx/bitstream/20.500.12059/6380/1/4_Nitr%20%20Elemento%20esencial%20.pdf.
- Estrada-Jiménez, P. M., Uvidia-Cabadiana, H. A., Herrera-Herrera, R. D. C., Hernández-Montiel, L. G., Verdecia-Acosta, D. M., Ramírez-de la Ribera, J. L. & Chacón-Marcheco, E. 2023. "Adaptability of regression algorithms to the behavior of protein plants". *Enfoque UTE*, 14(2): 20-34, ISSN: 1390-6542. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.861>.
- García-Parra, M. Á., Plazas-Leguizamón, N. Z., Rodríguez, D. C. C., Torrado, S. C. F., & Parra, J. D. 2018. "Descripción de las saponinas en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en relación con el suelo y el clima: una revisión". *Informador Técnico*, 82(2): 241-249, ISSN: 2256-5035. https://revistas.sena.edu.co/index.php/inf_tec/article/view/1451/1918.
- Giménez, B., Sanabria, M. & Salas, J. 2020. "Efecto del cultivo en dos pisos altitudinales sobre la síntesis de metabolitos secundarios en hojas de *Stevia rebusiana* Bertoni". *Ciencia y Desarrollo*, 23(2): 1-8, ISSN: 2409-2045. <http://dx.doi.org/10.21503/cyd.v23i2.2092>.
- Giraldo, L.M., Lizcano, L., Gisjman, A.J., Rivera, B. & Franco, L.H. 1998. Adaptación del modelo DSSAT para simular la producción de *Brachiaria decumbens*. *Pasturas Tropicales*, 20(2): 2-12, ISSN: 2310-2799. https://www.tropicalgrasslands.info/public/journals/4/Elements/DOCUMENTS/1998-vol20-rev1-2-3/Vol20_rev2_98_art2.pdf.
- Guerra, C., Cabrera, A. & Fernández, L. 2003. "Criteria for the selection of statistical models in scientific research". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 37(1): 3-9, ISSN: 2079-3480.
- Guillén-Andrade, H., Escalera-Ordaz, A.K., Torres-Gurrola, G., García-Rodríguez, Y.M., Espinosa-García, F.J. & Tapia-Vargas, L.M. 2019. "Identification of new secondary metabolites in *Persea americana* Miller variety *Drymifolia*". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 23: 253-265, ISSN: 2007-9230. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v10nspe23/2007-0934-remexca-10-spe23-253-en.pdf>.
- Herlina, T., Gaffar, S. & Widowati, W. 2018. "Cytotoxic activity of erypogein d from *Erythrina poeppigiana* (leguminosae) against cervical cancer (HeLa), breast cancer (MCF-7) and ovarian cancer (SKOV-3) cells". *IOP Science. Journal of Physics: Conference Series*, 1013(2018): 012198, ISSN: 1742-6596. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1013/1/012198>.
- Herlina, T., Haraswati, N., Apriani, R., Nishinarizki, V., Gaffar, S. & Supratman, U. 2019. "Cytotoxic Activity of Alpinumisoflavone from *Erythrina poeppigiana* (Leguminosae) Against Colon Cancer (WiDr), Cervical Cancer (Hela), and Hepatoma Cancer (HepG2) Cells". *HAYATI Journal of Biosciences*, 26(2): 96-100, ISSN: 2086-4094. <https://doi.org/10.4308/hjb.26.2.96>.
- Hernández-Espinoza, D.F., Lagunes-Espinoza, L.C., López-Herrera, M.A., Ramos-Juárez, J.A., González-Garduño, R. & Oliva-Hernández, J. 2020. "Edad de rebrote de *Erythrina americana* Miller y concentración de compuestos fenólicos en el

- follaje". *Madera y Bosques*, 26(1): e2611826, ISSN: 2448-7597. <https://doi.org/10.21829/myb.2020.2611826>.
- Herrera, R.S. & Hernández, Y. 1986. Predicción de la digestibilidad de la Bermuda cruzada 1 a partir del análisis químico de sus constituyentes. *Boletín técnico, Serie Pastos*, No. 2. EDICA, La Habana. p.91.
- Herrera, R.S., Verdecia, D.M. & Ramírez, J.L. 2020. "Chemical composition, secondary and primary metabolites of *Tithonia diversifolia* related to climate". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(3): 425-433. ISSN: 2079-3480. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/976>.
- Herrera, R.S., Verdecia, D.M., Ramírez, J.L., García, M. & Cruz, A.M. 2017a. "Secondary metabolites of *Leucaena leucocephala*. Their relationship with some climate elements, different expressions of digestibility and primary metabolites". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51 (1): 107-116, ISSN: 2079-3480. <http://cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/690>.
- Herrera, R.S., Verdecia, D.M., Ramírez, J.L., García, M. & Cruz, A.M. 2017b. "Relation between some climatic factors and the chemical composition of *Tithonia diversifolia*". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51 (2): 1-9, ISSN: 2079-3480. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/719>.
- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S. & Lauvergeat, V. 2011. "Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway". *Journal of Experimental Botany*, 28(8): 442-451, ISSN: 1460-2431. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq442>.
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H., Rahmat, A. & Rahmat, Z.A. 2011. "The relationship between phenolics and flavonoids production with total non-structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. Under high CO₂ and nitrogen fertilization". *Molecules*, 16(1): 162-174, ISSN: 1420-3049. <https://doi.org/10.3390/molecules16010162>.
- Isah, T. 2019. "Stress and defense responses in plant secondary metabolites production". *Biological Research*, 52(39): 1-25, ISSN: 0717-6287. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>.
- Karolewski, P., Zadworny, M., Mucha, J., Napierala-Filipiak, A. & Oleksyn, J. 2010. "Link between defoliation and light treatments on root vitality of five understory with different resistance to insect herbivory". *Tree Physiology*, 30(8): 969-978, ISSN: 0829-318X. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq060>.
- Keviste, A., Álvarez, J.G., Rojo, A. & Ruíz, A.D. 2002. Funciones de crecimiento de aplicación en el ámbito forestal. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Instituto de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid. España. 190pp.
- Leyva, E., Navarro-Tovar, G., Loredo-Carrillo, S. & Santos, M. 2011. "Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides". *Boletín de la Sociedad Química de México*, 5(2,3): 35-43, ISSN: 1870-1809. <http://bsqm.org.mx/pdf-boletines/V5/N1-3/08.-%20Leyva.pdf>.
- Li, Y., Konga, D., Fub, Y., Sussmand, M.R. & Wua, H. 2020. "The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants". *Plant Physiology and Biochemistry*, 148 (2020): 80-89, ISSN: 0981-9428. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>.
- Lozano, M.A.M., & Pichón, J.P.Z. 2018. "Ecología y aplicaciones de metabolitos secundarios de los géneros *Dictyota*, *Padina* y *Sargassum* (phaeophyta)". *Ciencia e Ingeniería*, 5(1): e065-e065, ISSN: 2389-9484. <http://revistas.uniguajira.edu.co/rev/index.php/cei/article/view/117>.
- Martín, D.A. 2017. "Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica". *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1): 81-104, ISSN: 2145-6453. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>.
- Massey, F.J. 1951. "The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit". *Journal of the American Statistical Association*, 4(543): 68-78, ISSN: 1537-274X. <http://dx.doi.org/10.2307/2280095>.
- Paumier, M., Méndez-Martínez, Y., Torres, E., Sánchez, A.R., Ramírez, J.L., Herrera, R.S., Santana, A. & Verdecia, D.M. 2020. "Indicators of Yield of *Tithonia diversifolia* in the Zone of Granma Province, Cuba". *Modern Concepts & Developments in Agronomy*, 6(4): MCDA. 000645, ISSN: 2637-7659. <https://doi.org/10.31031/MCDA.2020.06.000645>.
- Ramírez, J.L. 2010. Rendimiento y valor nutritivo de cinco gramíneas en el Valle del Cauto. Tesis de Doctorado. Universidad de Granma, Cuba. 101. p.
- Rivera, J.E., Chará, J., Gómez-Leyva, J.F., Ruíz, T. & Barahona, R. 2018. "Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible". *Livestock Research for Rural Development*, 30 (12): 1-20, ISSN: 2521-9952.
- Ryan, G.D., Rasmussen, S., Xue, H., Pearson, J. & Newman, A. 2014. "Metabolites analysis of the effects of elevated CO₂ and nitrogen fertilization on the association between tall fescue (*Schedonorus arundinaceus*) and its fungal symbiotic *Neotyphodium coenophialum*". *Plant, Cell and Environment*, 37(1): 204-212, ISSN: 1365-3040. <https://doi.org/10.1111/pce.12146>.
- Sieiro Miranda, G. L., González Marrero, A. N., Rodríguez Lema, E. L. & Rodríguez Regal, M. 2020. "Efecto de los macroelementos primarios en la susceptibilidad a enfermedades". *Centro Agrícola*, 47(3):66-74, ISSN: 2072-2001. <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v47n3/0253-5785-cag-47-03-66.pdf>.
- Soil Survey Staff. 2014. Keys to soil taxonomy. 12th ed. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service, Washington, United States. ISBN: 978-1-4296-8745-4. https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/class/taxonomy/?cid=nrcs142p2_053580.
- Torres, V. & Ortiz, J. 2005. "Application of modelling and simulation to the production and feeding of farm animals". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 39: 397-405, ISSN: 2079-3480
- Verdecia, D.M. 2014. Composición química y metabolitos secundarios en seis variedades de árboles, arbustos y leguminosas volubles en el Valle del Cauto. Ph.D. Thesis. Universidad de Granma, Cuba, p. 100.
- Verdecia, D.M., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Leonard, I., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., Valdés, C., Arceo, Y., Paumier, M., Santana, A., Álvarez, Y., Méndez-Martínez, Y. & López S. 2020. "Effect of age of regrowth, chemical composition and secondary metabolites on the digestibility of *Leucaena leucocephala* in the Cauto Valley, Cuba". *Agroforestry Systems*,

94(4): 1247-1253, ISSN: 0167-4366. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0339-y>.

Verdecia, D.M., Herrera-Herrera, R.C., Torres, E., Sánchez, A.R., Hernández-Montiel, L.G., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Bodas, R., Giráldez, F.J., Guillaume, J., Uvidia, H. & López, S. 2021. "Primary and secondary metabolites of six species of trees, shrubs and herbaceous legumes". Cuban Journal of Agricultural Science, 55(1): 77-93, ISSN: 2079-3480 <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/997>.

Wang, L., Cuia, J., Jina, B., Zhaoa, J., Xub, H., Lua, Z., Lia, W., Lid, X., Lie, L., Liangd, E., Raof, X., Wang, S., Fuh, C., Cao, F., Dixon, R.A. & Lin, J. 2020. "Multifeature analyses of vascular cambial cells reveal longevity mechanisms in old Ginkgo biloba trees". PNAS, 117(4): 2201–2210, ISSN: 0027-8424. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1916548117>.

Received: April 25, 2023

Accepted: July 15, 2023