

## Effect of growth age on the polyphenol content of materials from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.)

### Efecto de la edad de crecimiento en el contenido de polifenoles de materiales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.)

Idania Scull Rodríguez, Lourdes L. Savón Valdés, T. E. Ruíz and Magaly Herrera Villafranca

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

*Email: idascull@ica.co.cu*

Idania Scull Rodríguez: <http://orcid.org/0000-0002-9516-7182>

Lourdes L. Savón Valdés: <http://orcid.org/0000-0001-9880-0310>

T. E. Ruíz: <http://orcid.org/0000-0002-1690-1140>

Magaly Herrera Villafranca: <http://orcid.org/0000-0002-2641-1815>

The effect of growth age (30, 60 and 90 days) on the polyphenol content of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) materials collected in eastern Cuba was evaluated. A completely random design with 10 repetitions was applied. Total polyphenols and total condensed tannins were determined in seven tithonia materials (2, 3, 12, 14, 17, 23 and 24) in the rainy and dry seasons. An analysis of variance was performed, according to a completely random design in a 3 x 7 factorial arrangement. The factors were the growth age (30, 60 and 90 days) and the *T. diversifolia* materials (2, 3, 12, 14, 17, 23 and 24). There was an increase in phenolic compounds with growing age and the highest values were reached at 90 days. Material 3 showed the highest content of total polyphenols (4.62 % DM) in the dry season, and 12 reached the highest concentration of total condensed tannins (2.33 % DM) in the rainy season. The studied materials showed differences in the content and type of phenolic compounds in both seasons of the year. This experiment will help to select the materials with the greatest biological potential for animal feeding. Future researches are suggested to identify the biological activity of these substances and their relation with the beneficial effects in animals.

**Key words:** *secondary metabolites, tannins, buttercup, phytochemical composition*

*Tithonia diversifolia* is a fast-growing shrub, native to Central America, with appropriate agronomic characteristics for its exploitation and use in the edaphoclimatic conditions of Cuba (Ruiz *et al.* 2014). Its forage, of high nutritional value, is the subject of physiological, biochemical, productive and health researches to promote its use as animal food (Rodríguez *et al.* 2018 and Rodríguez *et al.* 2019).

Numerous secondary compounds, which are considered essential to prevent disease and other zootechnical damage, are reported in its composition (Rivera *et al.* 2018 and Ladeska *et al.* 2019). However, these can limit the use of the plant when are in high amounts. Chagas-Paula *et al.* (2012), González *et al.* (2019) and Ladeska *et al.* (2019) indicated the phenolic compounds among the majority groups of this species.

Phenolic compounds, also called polyphenols, are

Se evaluó el efecto de la edad de crecimiento (30, 60 y 90 días) en el contenido de polifenoles de materiales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.), recolectados en la zona oriental de Cuba. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 10 repeticiones. Se determinaron los polifenoles totales y los taninos condensados totales en siete materiales de tithonia (2, 3, 12, 14, 17, 23 y 24) en las épocas lluviosa y poco lluviosa. Se realizó análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial 3 x 7. Los factores fueron la edad de crecimiento (30, 60 y 90 días) y los materiales de *T. diversifolia* (2, 3, 12, 14, 17, 23 y 24). Hubo incremento de compuestos fenólicos con la edad de crecimiento y los mayores valores se alcanzaron a los 90 días. El material 3 mostró el contenido más elevado de polifenoles totales (4.62 % MS) en el período poco lluvioso, y el 12 alcanzó la mayor concentración de taninos condensados totales (2.33 % MS) en el período lluvioso. Los materiales estudiados mostraron diferencias en el contenido y clase de compuestos fenólicos en ambas épocas del año. Este experimento contribuirá a seleccionar los materiales de mayor potencial biológico para la alimentación animal. Se sugiere realizar investigaciones futuras, que puedan identificar la actividad biológica de estas sustancias y su relación con los efectos beneficiosos en los animales.

**Palabras clave:** *metabolitos secundarios, taninos, botón de oro, composición fitoquímica*

*Tithonia diversifolia* es un arbusto de rápido crecimiento, oriundo de Centroamérica, con características agronómicas apropiadas para su explotación y uso en las condiciones edafoclimáticas de Cuba (Ruiz *et al.* 2014). Su forraje, de alto valor nutritivo, es objeto de investigaciones fisiológicas, bioquímicas, productivas y de salud para propiciar su uso como alimento animal (Rodríguez *et al.* 2018 y Rodríguez *et al.* 2019).

Numerosos compuestos secundarios, que se consideran esenciales para prevenir enfermedades y otros daños zootécnicos, se informan en su composición (Rivera *et al.* 2018 y Ladeska *et al.* 2019). Sin embargo, estos pueden limitar el uso de la planta cuando se encuentran en cantidades elevadas. Chagas-Paula *et al.* (2012), González *et al.* (2019) y Ladeska *et al.* (2019) indicaron los compuestos fenólicos entre los grupos mayoritarios de esta especie.

Los compuestos fenólicos, también nombrados

a large group of secondary metabolites found in most plant-based foods. Current literature refers that diets rich in polyphenols can improve health and reduces the incidence of diseases in animals and humans (Prescha *et al.* 2018 and Scull *et al.* 2020). These compounds are attributed antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and antiviral properties (Rejeki *et al.* 2017 and Omokhua *et al.* 2018).

The objective of this study was to determine the effect of growth age on the polyphenol content of *Tithonia diversifolia* materials, collected in the eastern part of Cuba.

### Materials and Methods

**Location, soil and climate.** The study was carried out from 2017 to 2018, at the Miguel Sistachs Naya Experimental Center, from Instituto de Ciencia Animal de Cuba (ICA), located at 22°,81' North latitude and 82°,01' West longitude, in San José de Las Lajas, Mayabeque province (Academia de Ciencias de Cuba 1989). The samples of *Tithonia* materials studied are in the Institute germplasm bank. The soil in the area is red ferralitic, rapidly drying, clayey and deep on limestone (Hernández *et al.* 2019), moderately acidic with pH=6.1. The content of Ca, Mg and K was 7.86, 0.70 and 1.38 cmol/kg. Likewise, the P<sub>2</sub>O<sub>4</sub> was 81.64 kg/ha and the OM, 1.38 %. According to the data from ICA Meteorological Station, rainfalls in the experimental period averaged 84.3 mm, with a minimum monthly value of 0 mm in December and a maximum value of 231 mm (July). Figures 1 and 2 show the monthly distribution of rainfalls and days with rain in the experimental stage, as well as the historical mean.

**Treatments, design and collection of vegetative material.** The treatments consisted of the evaluation of seven materials (2, 3, 12, 14, 17, 23 and 24) of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (*Tithonia*), belonging to *Asteraceae* family, collected in Granma area, in

polifenoles, son un grupo extenso de metabolitos secundarios que se encuentran en la mayoría de los alimentos de origen vegetal. La literatura actual refiere que dietas ricas en polifenoles pueden mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades en animales y humanos (Prescha *et al.* 2018 y Scull *et al.* 2020). A estos compuestos se le atribuyen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y antivirales (Rejeki *et al.* 2017 y Omokhua *et al.* 2018).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la edad de crecimiento en el contenido de polifenoles de materiales de *Tithonia diversifolia*, recolectados en la zona oriental de Cuba.

### Materiales y Métodos

**Localización, suelo y clima.** El estudio se desarrolló de 2017 a 2018, en el Centro Experimental Miguel Sistachs Naya, del Instituto de Ciencia Animal de Cuba (ICA), ubicado en los 22°,81' de latitud Norte y 82°,01' longitud Oeste, en San José de las Lajas, en la provincia Mayabeque (Academia de Ciencias de Cuba 1989). Las muestras de los materiales de *Tithonia* estudiados se encuentran en el banco de germoplasma del propio Instituto. El suelo del área es ferralítico rojo, de rápida desecación, arcilloso y profundo sobre calizas (Hernández *et al.* 2019), moderadamente ácido con pH=6.1. El contenido de Ca, Mg y K fue de 7.86, 0.70 y 1.38 cmol/kg. Asimismo, el de P<sub>2</sub>O<sub>4</sub> fue de 81.64 kg/ha y la MO, de 1.38 %. Según los datos de la Estación Meteorológica del ICA, las precipitaciones en el período experimental promediaron 84.3 mm, con valor mínimo mensual de 0 mm en diciembre y valor máximo de 231 mm (julio). En las figuras 1 y 2 se muestra la distribución mensual de las lluvias y los días con lluvia en la etapa experimental, así como la media histórica.

**Tratamientos, diseño y colección del material vegetativo.** Los tratamientos consistieron en la evaluación de siete materiales (2, 3, 12, 14, 17, 23 y 24) de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (*tithonia*), pertenecientes a la familia *Asteraceae*, recolectados en la zona de Granma,

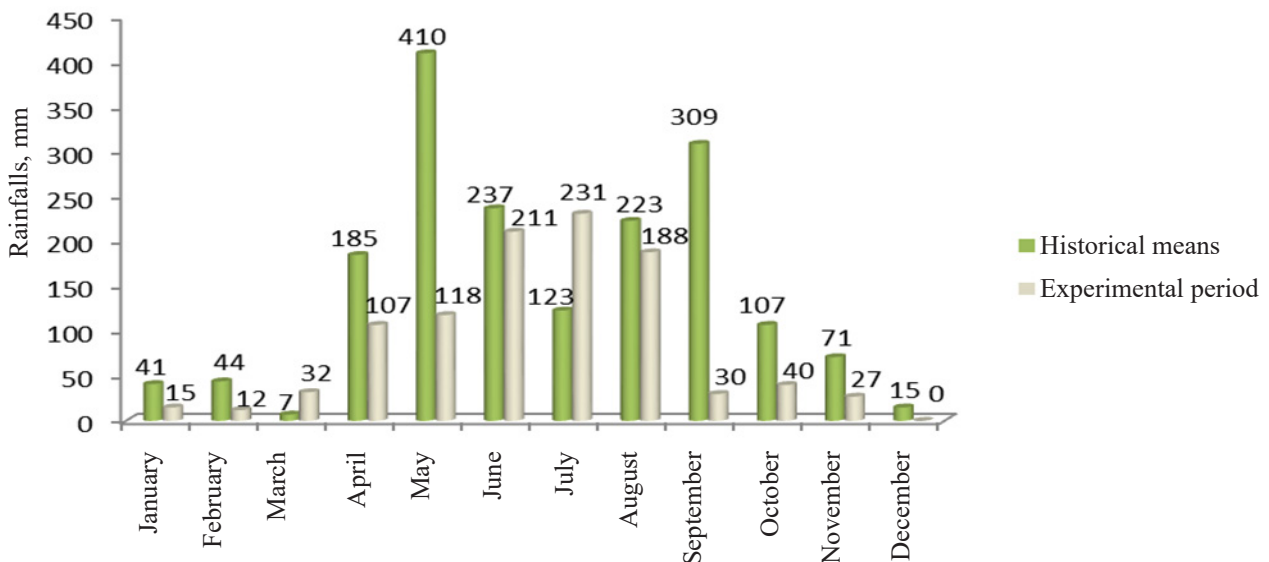


Figure 1. Performance of rainfalls in the experimental period

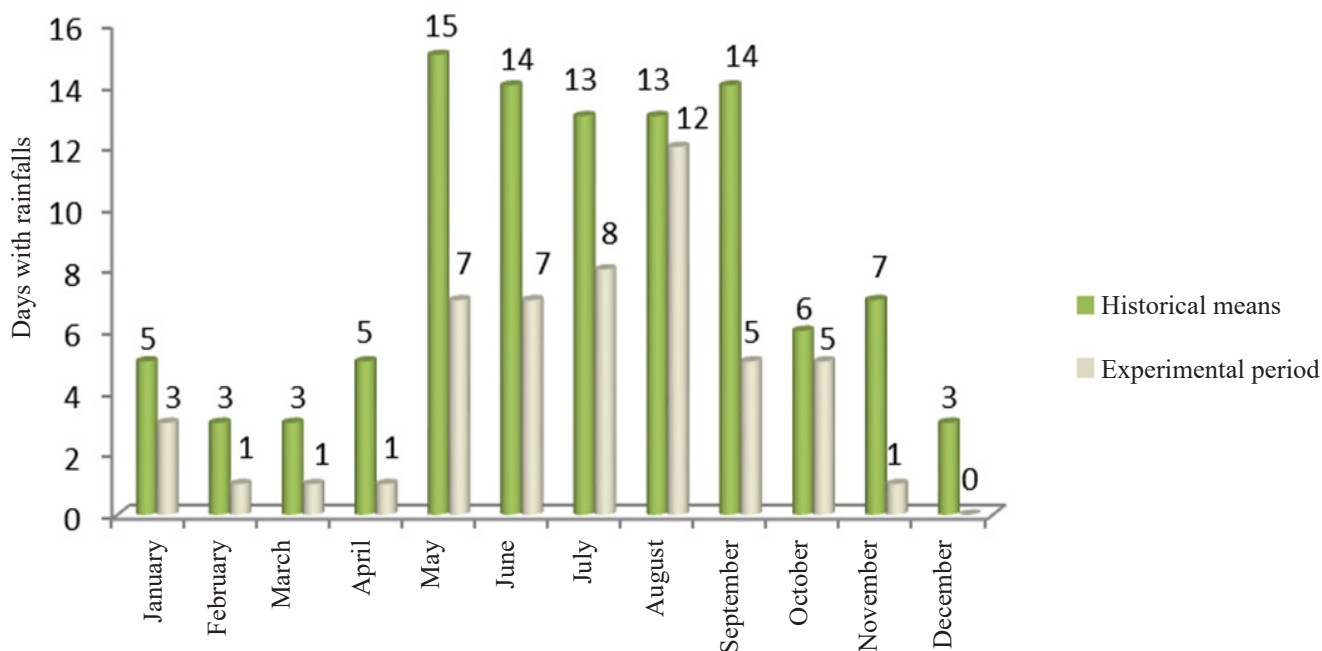


Figure 2. Performance of the days with rainfalls in the experimental period

eastern Cuba, through a completely random design, with ten repetitions. These materials were selected from the evaluation of 24 of them, according to their promising characteristics, agronomic response, chemical composition and ability to activate fermentative processes (Ruiz *et al.* 2018).

*Experimental procedure.* The sowing was carried out in the rainy season, at a distance between rows of 3.0 m and 50 cm between cuttings. Cuttings were used for planting, taken from the middle part of the stem, with an age of 80 days, a diameter of 2 cm and a length of 50 cm, in furrows 15 cm deep. The area was clean of weeds using a hoe and in dry conditions.

To start the experiment, the plantation was cut at a height of 15 cm, 120 d after sowing. A total of 10 plants (leaves and petioles) were random sampled for each of the ages (30, 60 and 90 d). The materials were dried in a forced air oven at 60 °C for 48 hours. Then they were milled to a particle size of 1 mm. The forage meal of each material was stored in amber- glass bottles, which were hermetically sealed until the time of performing the chemical analyses.

*Determination of total polyphenols.* The extraction of the phenolic compounds was carried out in an ultrasonic bath (Randelin Sonorex brand, series 2000) for 15 min., with an acetone solution at 70 % v/v. The content of total polyphenols (TP) was determined by using the Folin-Ciocalteu reagent, according to Makkar (2003) method. Analyzes were performed in triplicate. To determine the concentration of TP, a reference solution of tannic acid (Sigma Aldrich) of concentration (0.5 g/L) was used. Concentrations of 10 to 30 g/L of the reference solution were used in the preparation of the calibration curve.

*Quantification of total condensed tannins.* Total condensed tannins (TCT) were quantified from the

en el oriente de Cuba, mediante un diseño completamente aleatorizado, con diez repeticiones. Dichos materiales se seleccionaron de la evaluación de 24 de ellos, según sus características promisorias, respuesta agronómica, composición química y capacidad para activar los procesos fermentativos (Ruiz *et al.* 2018).

*Procedimiento experimental.* La siembra se efectuó en el período lluvioso, a una distancia entre surcos de 3.0 m y 50 cm entre estacas. Para la plantación se utilizaron estacas, tomadas de la parte media del tallo, con edad de 80 d, diámetro de 2 cm y de 50 cm de largo, en surcos de 15 cm de profundidad. El área se mantuvo limpia de malezas mediante azadón y en condiciones de secano.

Para iniciar el experimento, el corte de la plantación se efectuó a 15 cm de altura, transcurridos 120 d de la siembra. Se muestrearon 10 plantas (hojas y peciolos) al azar para cada una de las edades (30, 60 y 90 d). Los materiales se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C, durante 48 horas. Luego, se molinaron a tamaño de partícula de 1 mm. La harina de forraje de cada material se guardó en frascos de cristal de color ámbar, que se cerraron herméticamente hasta el momento de realizar los análisis químicos.

*Determinación de polifenoles totales.* La extracción de los compuestos fenólicos se efectuó en baño ultrasónico (marca Randelin Sonorex, serie 2000) durante 15 min., con una disolución de acetona al 70 % v/v. El contenido de polifenoles totales (PT) se determinó mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método de Makkar (2003). Los análisis se realizaron por triplicado. Para determinar la concentración de PT, se utilizó una disolución de referencia de ácido tánico (Sigma Aldrich) de concentración (0.5 g/L). En la preparación de la curva de calibración se utilizaron concentraciones de 10 a 30 g/L de la disolución de referencia.

*Cuantificación de los taninos condensados totales.* Los taninos condensados totales (TCT) se cuantificaron

extract of phenolic compounds, according to Makkar (2003) methodology. For the determination, the reagent butanol/HCl 95:5 v/v was used in the presence of heat. The absorbance of the solution was read in a spectrophotometer at 550 nm, using the unheated mixture as reference.

**Statistical analysis.** For the analysis of the results, the statistical system Infostat (Di Rienzo *et al.* 2012) was used. An analysis of variance was performed, according to a completely random design in a 3 x 7 factorial arrangement. Growth age (30, 60, 90 d) and *T. diversifolia* materials (2, 3, 12, 14, 17, 23, 24) were considered as factors. Duncan's test was applied to compare the differences between means (Duncan 1955). Where the interaction was non-significant, the main effects were reported.

### Results and Discussion

The content of total polyphenols in the dry season (table 1) showed interaction between the factors growth age (30, 60, 90 d) and *T. diversifolia* materials (2, 3, 12, 14, 17, 23, 24). However, in the total condensed tannins there were not interactions. The main effects are shown in figures 3 and 4.

a partir del extracto de compuestos fenólicos, según la metodología de Makkar (2003). Para la determinación se empleó el reactivo butanol/HCl 95:5 v/v en presencia de calor. La absorbancia de la solución se leyó en un espectrofotómetro a 550 nm, usando como referencia la mezcla sin calentar.

**Análisis estadístico.** Para el análisis de los resultados, se utilizó el sistema estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2012). Se realizó análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial 3 x 7. Se consideraron como factores la edad de crecimiento (30, 60, 90 d) y los materiales de *T. diversifolia* (2, 3, 12, 14, 17, 23, 24). Se aplicó la dócima de Duncan para comparar las diferencias entre medias (Duncan 1955). En los casos en que la interacción fue no significativa, se informaron los efectos principales.

### Resultados y Discusión

El contenido de polifenoles totales en el período poco lluvioso (tabla 1) mostró interacción entre los factores edad de crecimiento (30, 60, 90 d) y materiales de *T. diversifolia* (2, 3, 12, 14, 17, 23, 24). Sin embargo, en los taninos condensados totales no se encontraron dichas interacciones. Los efectos principales se muestran en las figuras 3 y 4.

Table 1. Total polyphenols content in *T. diversifolia* forage meal in the dry season

Indicators, % DM	Materials	Growth age			SE ( $\pm$ ) Signif.
		30	60	90	
Total polyphenols	2	0.95 <sup>r</sup>	2.15 <sup>h</sup>	2.43 <sup>f</sup>	0.01 P < 0.0001
	3	1.14 <sup>p</sup>	1.99 <sup>i</sup>	4.62 <sup>a</sup>	
	12	1.67 <sup>l</sup>	1.85 <sup>j</sup>	2.21 <sup>g</sup>	
	14	1.02 <sup>q</sup>	1.82 <sup>k</sup>	2.58 <sup>c</sup>	
	17	1.60 <sup>m</sup>	1.65 <sup>l</sup>	4.04 <sup>c</sup>	
	23	1.21 <sup>o</sup>	1.84 <sup>k</sup>	3.57 <sup>d</sup>	
	24	1.26 <sup>n</sup>	1.66 <sup>l</sup>	4.35 <sup>b</sup>	

Different letters indicate significant differences for P < 0.05, according to Duncan (1955)

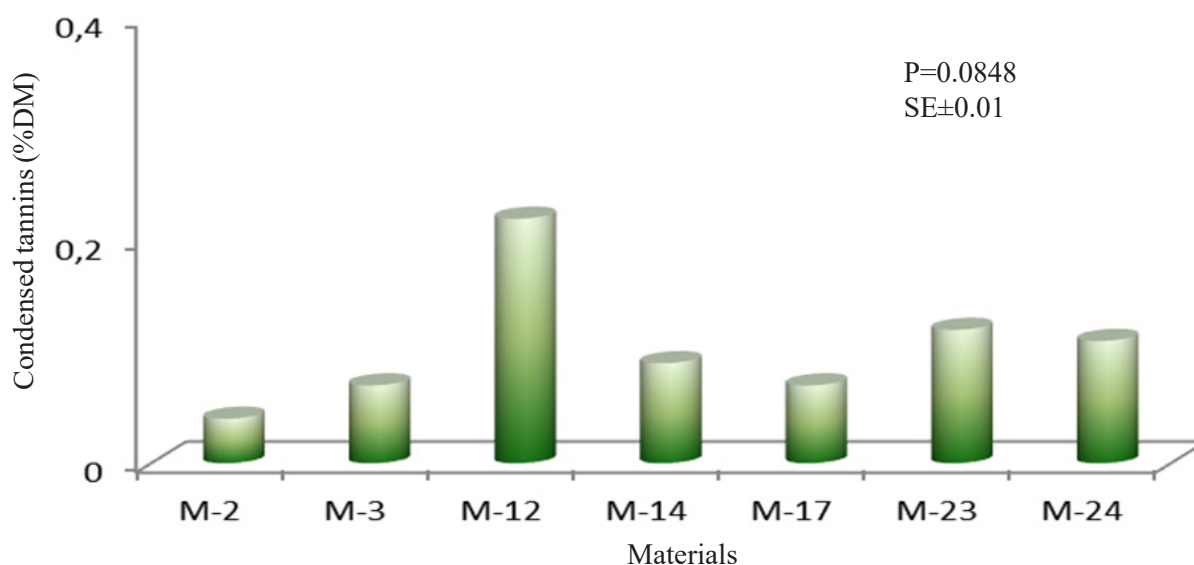


Figure 3. Total condensed tannin content in *T. diversifolia* materials in the dry season

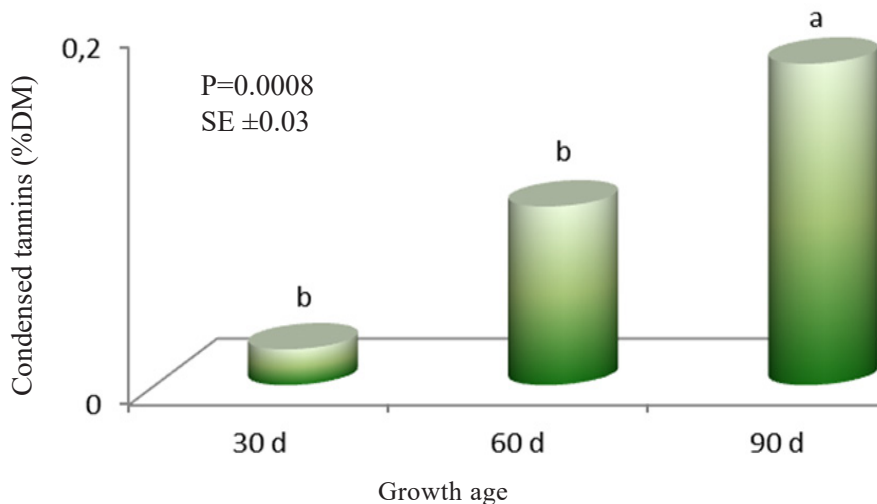


Figure 4. Total condensed tannin content of *T. diversifolia* materials with different growth ages in the dry season

In the dry season, the TP content differed between the materials. It increased ( $P < 0.0001$ ) with the growing age and the highest values were reached at 90 d. Material 3 showed the highest concentrations.

The concentration of TCT did not differ between the materials studied in this period. However, the evaluation of the growth age factor showed variations between days. The highest values ( $P = 0.0008$ ) were recorded at 90 d.

In the rainy season, there were interactions between the *Tithonia* materials and the days of growth for TP and TCT (table 2).

En el período poco lluvioso, el contenido de PT difirió entre los materiales. Se incrementó ( $P < 0.0001$ ) con la edad de crecimiento y los mayores valores se alcanzaron a los 90 d. El material 3 mostró las mayores concentraciones.

La concentración de TCT no difirió entre los materiales estudiados en este período. Sin embargo, la evaluación del factor edad de crecimiento mostró variaciones entre los días. Los mayores valores ( $P = 0.0008$ ) se registraron a los 90 d.

En el período lluvioso se encontraron interacciones entre los materiales de *Tithonia* y los días de crecimiento para los PT y los TCT (tabla 2).

Table 2. Content of total polyphenols and total condensed tannins in the forage meal of *T. diversifolia* materials in the rainy season

Indicators, % DM	Materials	Growth age			SE ( $\pm$ ) Signif.
		30	60	90	
Total polyphenols	2	0.35 <sup>lm</sup>	0.45 <sup>k</sup>	0.49 <sup>j</sup>	0.01 $P < 0.0001$
	3	0.45 <sup>k</sup>	0.64 <sup>i</sup>	0.74 <sup>fg</sup>	
	12	0.74 <sup>fg</sup>	0.78 <sup>de</sup>	0.92 <sup>a</sup>	
	14	0.34 <sup>m</sup>	0.47 <sup>jk</sup>	0.75 <sup>efg</sup>	
	17	0.21 <sup>n</sup>	0.39 <sup>l</sup>	0.77 <sup>def</sup>	
	23	0.77 <sup>ef</sup>	0.87 <sup>b</sup>	0.83 <sup>c</sup>	
	24	0.68 <sup>h</sup>	0.73 <sup>g</sup>	0.81 <sup>cd</sup>	
Condensed tannins	2	0.18 <sup>n</sup>	0.38 <sup>m</sup>	0.42 <sup>l</sup>	0.01 $P < 0.0001$
	3	0.52 <sup>k</sup>	0.74 <sup>i</sup>	1.22 <sup>e</sup>	
	12	0.33 <sup>m</sup>	0.88 <sup>h</sup>	2.33 <sup>a</sup>	
	14	0.40 <sup>l</sup>	0.63 <sup>j</sup>	0.98 <sup>g</sup>	
	17	0.34 <sup>m</sup>	1.02 <sup>f</sup>	1.34 <sup>d</sup>	
	23	0.62 <sup>j</sup>	1.45 <sup>c</sup>	1.67 <sup>b</sup>	
	24	0.65 <sup>j</sup>	1.23 <sup>e</sup>	1.44 <sup>c</sup>	

Different letters indicate significant differences for  $P < 0.05$ , according to Duncan (1955)

In the rainy season, the concentrations of TP and TCT differed between materials and increased ( $P < 0.0001$ ) with the growth age. The highest values were reached at 90 d. In material 12 the highest levels

En la etapa lluviosa, las concentraciones de PT y TCT difirieron entre los materiales y se incrementaron ( $P < 0.0001$ ) con la edad de crecimiento. Los mayores valores se alcanzaron a los 90 d. En el material 12 se encontraron los

of these metabolites were found (0.92 and 2.33 % DM).

The content of TP and TCT in this experiment showed an increase with the growth age, regardless of the season of the year. Boukhris *et al.* (2015) studied the effect of the phenological state on the chemical composition of essential oils from plants of the *Pelargonium graveolens* species. These authors pointed out that the expression and activity of the genes and enzymes involved in secondary metabolism vary with the different stages of plant development.

Verdecia *et al.* (2018), when studying the chemical composition of *T. diversifolia*, reported that this performance can be related to the increase in the synthesis of phenolic compounds during the maturation stage of the plant. These authors found an increase in the concentration of TP and TCT up to 180 d (0.64 and 1.45 % DM) in the rainy season. The TP content was lower than that obtained in this study. While the TCT levels were lower than those found in the rainy season, and higher than those recorded in the dry season. Omokhua *et al.* (2018) evaluated the phytomedicinal potential of *T. diversifolia* cultivated in Africa, and found TP concentrations of 1.49 % DM. These results were higher than those obtained in this study in the rainy season and lower than those of the dry season. These differences could be controlled by other factors, which also affect the development of the plant in the ecosystem: environmental variations, genotype, growth rate, nutritional conditions of the soil, and predation (Sampaio and Da Costa 2018).

In this study, the variability in the concentration and class of phenolic compounds that the materials had between the experimental periods can be attributed to the environmental conditions in which the plants were developed and their genetic characteristics.

Sampaio *et al.* (2016), when researching the influence of different environmental factors on the metabolite profile of *T. diversifolia*, argued that plants under stress conditions, induced by climatic factors, can cause changes in the production of different types of metabolites. In addition, the mentioned authors point out that stress due to solar radiation, specifically UV-B (280-320 nm), affects the production of phenolic compounds: tannins, anthocyanins, flavonoids and derivatives of cinnamic acid. These compounds help dissipate solar energy and protect against the deleterious effects of UV radiation.

Herrera *et al.* (2020), when studying the secondary metabolites of *T. diversifolia* related to climate, found high correlations of phenolic compounds with temperatures (maximum, minimum and average). The best correlations were obtained in total condensed tannins and free condensed tannins, with temperatures, rainfalls and its distribution.

During the development of the experiment, the volume of rain fell considerably, as well as the number of rainy days with respect to the historical average

mayores valores de estos metabolitos (0.92 y 2.33 % MS).

El contenido de PT y TCT en este experimento mostró incremento con la edad de crecimiento, independientemente del período del año. Boukhris *et al.* (2015) estudiaron el efecto del estado fenológico en la composición química de aceites esenciales de plantas de la especie *Pelargonium graveolens*. Estos autores señalaron que la expresión y actividad de los genes y enzimas involucrados en el metabolismo secundario varían con los diferentes estados de desarrollo de la planta.

Verdecia *et al.* (2018), al estudiar la composición química de *T. diversifolia* refirieron que este comportamiento se puede relacionar con el incremento de la síntesis de compuestos fenólicos durante la etapa de maduración de la planta. Estos autores encontraron aumento de la concentración de PT y TCT hasta los 180 d (0.64 y 1.45 % MS) en el período lluvioso. El contenido de PT fue inferior al obtenido en este estudio. Mientras que los valores de TCT resultaron inferiores a los hallados en la estación lluviosa, y superiores a los registrados en la poca lluviosa. Omokhua *et al.* (2018) evaluaron el potencial fitomedicinal de la *T. diversifolia* cultivada en África, y hallaron concentraciones de PT de 1.49 % MS. Estos resultados fueron superiores a los obtenidos en este estudio en el período lluvioso e inferiores a los de la época poca lluviosa. Estas diferencias pudieran estar controladas por otros factores, que también afectan el desarrollo de la planta en el ecosistema: variaciones ambientales, genotipo, velocidad de crecimiento, condiciones nutricionales del suelo y depredación (Sampaio y Da Costa 2018).

En este estudio, la variabilidad en la concentración y clase de compuestos fenólicos que presentaron los materiales entre los períodos experimentales, se puede atribuir a las condiciones ambientales en que se desarrollaron las plantas y a sus particularidades genéticas.

Sampaio *et al.* (2016), al investigar la influencia de diferentes factores ambientales en el perfil de metabolitos de la *T. diversifolia*, argumentaron que las plantas en las condiciones de estrés, inducidas por los factores climáticos, pueden causar cambios en la producción de diferentes clases de metabolitos. Además, los autores citados señalan que el estrés por radiación solar, específicamente UV-B (280-320 nm), afecta la producción de compuestos fenólicos: taninos, antocianinas, flavonoides y derivados del ácido cinámico. Estos compuestos contribuyen a disipar la energía solar y protegen de los efectos deletéreos de las radiaciones UV.

Herrera *et al.* (2020), al estudiar los metabolitos secundarios de *T. diversifolia* relacionados con el clima, encontraron altas correlaciones de los compuestos fenólicos con las temperaturas (máxima, mínima y media). Las mejores correlaciones se obtuvieron en los taninos condensados totales y los taninos condensados libres, con las temperaturas, las lluvias y su distribución.

Durante el desarrollo del experimento disminuyó considerablemente el volumen de lluvia caída, así como la cantidad de días de lluvia con respecto a la media

(figures 1 and 2), which undeniably had an effect on the development of the plants.

Water stress could cause a reduction in the photosynthetic rate and, consequently, an increase in the production of reactive oxygen species (ROS). To overcome stress limitations, plants adopted alternative mechanisms. These involved the increase in the production of phenolic substances (natural antioxidants) to eliminate ROS, maintain redox balance and be able to survive in adverse conditions (Khare *et al.* 2020). According to Morales *et al.* (2017), anthocyanins, substances with high antioxidant activity, accumulate in plant tissues and provide resistance to drought conditions.

Phenolic compounds are metabolites that are characterized by having one or more aromatic rings in their molecular structure, joined to at least one hydroxyl group (Huajun *et al.* 2016). This configuration is what gives them their high antioxidant capacity, so they can eliminate free radicals by donating hydrogen atoms and protect the plant from the damage they cause (González *et al.* 2019). However, relatively high concentrations of these metabolites can hinder growth, in response to different types of stress (Khare *et al.* 2020). The results of this experiment corroborate this hypothesis. Material 3 showed the highest concentration of TP in the dry season. Ruiz *et al.* (2018), when evaluating the growth of these *T. diversifolia* materials, showed that material 3 highlighted in the slow recovery group, at 30 d. Also, it did not change in its growth over time (30, 60 and 90 d), and was always part of the group with the lowest growth.

The differences found in the responses of each plant material under the same environmental conditions suggest that genetic characteristics also influenced on the composition of these compounds. Chemical variation in a species can influence on its climatic adaptation and protection against different stress factors. This supports their ability to survive and resist (Del Val-Días *et al.* 2017).

The equality in the content of TCT, which was observed in the materials in the dry season, could indicate that they reacted in a similar way to environmental stress in this climatic season. The materials emitted similar responses to physiological changes associated with adverse environmental conditions, which led to the synthesis of similar concentrations of CT (Valares 2011). The CT levels found in this study did not exceed the limits in which intake and digestibility can be affected (García *et al.* 2008). Considering the beneficial effects associated with these compounds, the incorporation of forages in ruminant diets could reduce methane emissions, as well as improve weight gain, some meat quality parameters and milk production of productive animals (Jenko *et al.* 2018 and Ku-Vera *et al.* 2020).

histórica (figuras 1 y 2), lo que innegablemente tuvo efecto en el desarrollo de las plantas.

El estrés hídrico pudo causar reducción de la tasa fotosintética y, en consecuencia, aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). Para superar las limitaciones del estrés, las plantas adoptaron mecanismos alternativos. Estos implicaron el incremento en la producción de sustancia fenólicas (antioxidantes naturales) para eliminar las EROs, mantener el equilibrio redox y poder sobrevivir en condiciones adversas (Khare *et al.* 2020). Según Morales *et al.* (2017), las antocianinas, sustancias con elevada actividad antioxidante, se acumulan en los tejidos de las plantas y proporcionan resistencia ante las condiciones de sequía.

Los compuestos fenólicos son metabolitos que se caracterizan por poseer en su estructura molecular uno o más anillos aromáticos, unidos al menos a un grupo hidroxilo (Huajun *et al.* 2016). Esta configuración es lo que le confiere su alta capacidad antioxidante, por lo que pueden eliminar los radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno y proteger a la planta de los daños que le ocasionan (González *et al.* 2019). Sin embargo, concentraciones relativamente altas de estos metabolitos pueden obstaculizar el crecimiento, en respuesta a diferentes tipos de estrés (Khare *et al.* 2020). Los resultados de este experimento corroboran esta hipótesis. El material 3 presentó la mayor concentración de PT en el período poco lluvioso. Ruiz *et al.* (2018), al evaluar el crecimiento de estos materiales de *T. diversifolia*, indicaron que el material 3 se destacó en el grupo de lenta recuperación, a los 30 d. Además, no cambió en su crecimiento durante el tiempo (30, 60 y 90 d), y siempre formó parte del grupo de menor crecimiento.

Las diferencias que se encontraron en las respuestas de cada material vegetal en iguales condiciones ambientales apuntan a que las características genéticas también influyeron en la composición de estos compuestos. La variación química en una especie puede influir en su adaptación climática y en la protección contra diferentes factores de estrés. Esto respalda su capacidad de sobrevivencia y resistencia (Del Val-Días *et al.* 2017).

La paridad en el contenido de TCT, que se apreció en los materiales en el período poco lluvioso, pudiera indicar que reaccionaron de forma semejante ante el estrés ambiental en esta estación climática. Los materiales emitieron respuestas similares ante alteraciones fisiológicas, asociadas a las condiciones ambientales adversas, que conllevaron a la síntesis de concentraciones parecidas de TC (Valares 2011). Los valores de TC encontrados en este trabajo no excedieron los límites en los que se puede afectar el consumo y la digestibilidad (García *et al.* 2008). Al considerar los efectos beneficiosos que se asocian a estos compuestos, la incorporación de los forrajes en las dietas de los rumiantes podría reducir las emisiones de metano, así como mejorar la ganancia de peso, algunos indicadores de calidad de carne y la producción de leche de los animales productivos (Jenko *et al.* 2018 y Ku-Vera *et al.* 2020).

## Conclusions

The *T. diversifolia* materials showed differences in the content and type of phenolic compounds in both seasons of the year, with their concentrations increasing as plant growth progressed. These studies will contribute to selecting the materials with the greatest biological potential for animal feeding. Future researches are recommended, which can elucidate the biological activity of these substances and their relation with the beneficial effects in animals.

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest between them.

### Authors contribution

Idania Scull Rodríguez: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing original draft.

Lourdes L. Savón Valdés: Conceptualization, Methodology.

T. E. Ruíz: Conceptualization, Methodology.

Magaly Herrera Villafranca: Formal analysis.

## Conclusiones

Los materiales de *T. diversifolia* mostraron diferencias en el contenido y clase de compuestos fenólicos en ambas épocas del año con el aumento de sus concentraciones, en la medida que avanzó el crecimiento de las plantas. Estos estudios contribuirán a seleccionar los materiales de mayor potencial biológico para la alimentación animal. Se recomiendan investigaciones futuras, que puedan dilucidar la actividad biológica de estas sustancias y su relación con los efectos beneficiosos en los animales.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

### Contribución de los autores

Idania Scull Rodríguez: Conceptualización, Investigación, Metodología, Redacción, borrador original.

Lourdes L. Savón Valdés: Conceptualización, Metodología.

T.E. Ruíz: Conceptualización, Metodología.

Magaly Herrera Villafranca: Análisis formal.

## References

- Academia de Ciencias de Cuba. 1989. Nuevo Atlas Nacional de Cuba. Instituto Cubano de Geodesia y Cartografía. La Habana, Cuba, p. 41.
- Boukhris, M., Hadrich, F., Chtourou, H., Dhoub, A., Bouaziz, M. & Sayadi, S. 2015. "Chemical composition, biological activities and DNA damage protective effect of *Pelargonium graveolens* L'Hér. Essential oils at different phenological stages". *Industrial Crops and Products*, 74: 600–606, ISSN: 0926-6690. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.051>.
- Chagas-Paula, D.A., Oliveira, R.B., Rocha, B.A. & Da Costa, F.B. 2012. "Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (*Asteraceae*)". *Chemistry & Biodiversity*, 9(2): 210-235, ISSN: 1612-1872. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100019>.
- Del Val-Díaz, R., Miranda-Ramírez, J.M., Flores-Estrada, M.X., Gómez-Leyva, J.F., Solorio-Sánchez, B., Solorio-Sánchez, F.J. & González-Palomares, S. 2017. "Diversidad genética de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray de Michoacán: análisis con marcadores de ADN-SSR". *Ciencia y Tecnología Universitaria*, 4(3): 10-14, ISSN: 2007-7750, <https://doi.org/reaixon.ut.leon.edu.mx>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X. <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- García, D.E., Medina, M.G., Clavero, T., Humbria, J., Baldizán, A. & Domínguez, C.E. 2008. "Preferencias de árboles forrajeros por cabras en las zonas bajas de los Andes venezolanos". *Revista Científica, FCV-LUZ*, 18(2): 188-196, ISSN: 0798:2259.
- González, L., Díaz, M., Castro, I., Fonte, L., Lugo, Y. & Altunaga, N. 2019. "Pytochemical characterization and total antioxidant activity of different extracts from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray". *Pastos y Forrajes*, 42(3): 243-248, ISSN: 2078-8452.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. & Castro, N. 2019. "Clasificación de los suelos de Cuba: énfasis en la versión de 2015". *Cultivos Tropicales*, 4(1): a15-e15, ISSN: 1819-4087.
- 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.
- Huajun, Lv., Li, J., Wu, Y., Garyali, S. & Wang, Y. 2016. "Transporter and its engineering for secondary metabolites". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14): 6119-6130, ISSN: 0171-1741. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7605-6>.
- Jenko, C., Bonato, P., Fabre, R., Perlo, F., Tisocco, O. & Teira, G. 2018. "Adición de taninos a dietas de rumiantes y su efecto sobre la calidad y rendimiento de la carne". *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 29(56): 224-241, ISSN: 1851-1716.
- Khare, S., Singh, N.B., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V., Bano, C., Yadav, R.K. & Amist, N. 2020. "Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints". *Journal of Plant Biology*, 63(11): 1-14, ISSN: 1438-8677. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09245-7>.
- Ku-Vera, J.C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S.S., Montoya-Flores, M.D., Molina-Botero, I.C., Arango, J., Gómez-Bravo, C.A., Aguilar-Pérez, C.F. & Solorio-Sánchez, F.J. 2020. "Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminant". *Frontiers Veterinary Science*, 7(584): 1-14, ISSN: 2297-1769. <https://doi.org/10.3389/fvet.2020.00584>.



- Ladeska, V., Dewanti, E. & Sari, D.I. 2019. "Pharmacognostical studies and determination of total flavonoides of Paitan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)". *Pharmacognosy Journal*, 11(6): 1256-1261, ISSN: 0975-3575. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.195>.
- Makkar, H.P.S. 2003. *Quantification of tannins in tree and shrub foliage. A laboratory manual*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 102 pp, ISBN: 4020-1632-8.
- Morales, A., Zurita-Silva, A., Maldonado, J. & Silva, H. 2017. "Transcriptional responses of Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under water deficit conditions uncovers ABA-independent expression patterns". *Frontiers Plant Science*, 8: 1-13, ISSN: 1664-462X. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00216>.
- Omokhua, A.G., Abdalla, M.A., Staden, J.V. & McGaw, L.J. 2018. "A comprehensive study of the potential phytochemical use and toxicity of invasive *Tithonia* species in South Africa". *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(272): 2-15, ISSN: 1472-6882. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2336-0>.
- Prescha, A., Zabłocka-Słowińska, K., Płaczkowska, S., Gorczyca, S., Łuczak, A., Majewska, M. & Grajeta, H. 2018. "Diet quality and its relationship with antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(8506343): 1-10, ISSN: 1942-0900. <https://doi.org/10.1155/2018/8506343>.
- Rejeki, D., Hardian, S. & Addy, S. 2017. "Antimicrobial Activity of *Tithonia diversifolia*, *Elephantopus scaber*, and *Kigelia africana* Against Plant Pathogens". *Frontiers in Environmental Microbiology*, 3(4): 56-61, ISSN: 2469-7869. <https://doi.org/10.11648/j.fem.20170304.11>.
- 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): 64, ISSN: 0121-3784. <http://www.lrrd.org/lrrd22/6/olug22118.htm>.
- Rodríguez, B., Savón, L., Vázquez, Y., Ruiz, T.E. & Herrera, M. 2018. "Evaluación de la harina de forraje de *Tithonia diversifolia* para la alimentación de gallinas ponedoras". *Livestock Research for Rural Development*, 30(3):8-16, ISSN: 0121-3784, <http://www.lrrd.org/lrrd22/6/olug22118.htm>.
- Rodríguez, R., Galindo, J., Ruiz, T., Scull, I. & Gómez, S. 2019. "Valor nutritivo de siete ecotipos de *Tithonia diversifolia* colectados en la zona oriental de Cuba. *Livestock Research for Rural Development*, 31(8):40-48, ISSN: 0121-3784. <http://www.lrrd.org/lrrd22/6/olug22118.htm>.
- Ruiz, T.E., Alonso, J., Torres, V., Valenciaga, N., Galindo, J., La O, O., Febles, G., Díaz, H., Tuero, R. & Mora, C. 2018. "Evaluation of materials collected from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray in the area of Las Tunas and Granma in eastern Cuba". *Avances en Investigación Agropecuaria*, 22(1): 19-27, ISSN: 0188789-0.
- Ruiz, T.E., Febles, G.J., Galindo, J., Savón, L., Chongo, B., Torres, V., Cino, D.M., Alonso, J., Martínez, Y., Gutiérrez, D., Crespo, G., Mora, L.M., Scull, I., La O, O., González, J., Lok, S., González, N. & Zamora, Z. 2014. "*Tithonia diversifolia*, its possibilities in cattle rearing systems". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(1):79-82, ISSN: 2079-3480.
- Sampaio, B.L. & Da Costa, F.B. 2018. "Influence of abiotic environmental factors on the main constituents of the volatile oils of *Tithonia diversifolia*". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28 (2): 135-144, ISSN: 0102-695X. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.02.005>.
- Sampaio, B.L., Edrada-Ebel, R. & Da Costa, F.B. 2016. "Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants". *Scientific Reports*, 6: 29265, ISSN: 2045-2322. <http://dx.doi.org/10.1038/srep29265>.
- Scull, I., Savón, L., Spengler, I. & Herrera, M. 2020. "Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Mucuna pruriens* (L) cv. utilis forage meal and their polyphenols extract in Sprague Dowley rats". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(2): 243-255, ISSN: 2079-3480.
- Valares, C. 2011. *Variación del metabolismo secundario en plantas debido al genotipo y al ambiente*. Tesis en opción al Grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Extremadura, España.
- Verdecia, D.M., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Bodas, R., Leonard, I., Giráldez, F.J., Andrés, S., Santana, A., Méndez-Martínez, Y. & López, S. 2018. "Yield components, chemical characterization and polyphenolic profile of *Tithonia diversifolia* in Valle del Cauto, Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4): 457-471, ISSN: 2079-3480.

**Received: December 15, 2021**

**Accepted: April 29, 2022**