

Secondary metabolites of *Leucaena leucocephala*. Their relationship with some climate elements, different expressions of digestibility and primary metabolites

Metabolitos secundarios de *Leucaena leucocephala*. Su relación con algunos elementos del clima, diferentes expresiones de digestibilidad y metabolitos primarios

R. S. Herrera¹, D. M. Verdecia², J. L. Ramírez², M. García¹ and Ana M. Cruz¹

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Universidad de Granma, Carretera de Manzanillo km 17½, Universidad de Granma, Bayamo, Cuba

Email: rherrera@ica.co.cu

Pearson correlation coefficients were established among secondary metabolites of *Leucaena leucocephala* and some climatic factors (maximum, minimum and mean temperature, rainfall and number of rainy days), primary metabolites and digestibility (organic matter, dry matter, protein and NDF). The metabolites were A) secondary: total tannins, total phenols, total condensed tannins, free condensed tannins, alkaloids, saponins, triterpenes, steroids and flavonoids and B) primary: glucose, fructose, sucrose and N. Secondary metabolites were correlated with the maximum temperature and the highest coefficient ($r = 0.78$) was for steroids. Similar result was obtained for condensed tannins bound to the fiber, but with the minimum temperature ($r = -0.90$). The highest coefficient for the number of rainy days was presented in flavonoids ($r = 0.99$), while for total rainfall coefficient, it was for total phenols ($r = -0.90$). Correlation coefficients between the secondary metabolites and OMD ranged from -0.57 to -0.74 . For the *in vitro* of dry matter digestibility, they ranged between -0.65 and -0.94 and for NDF between -0.91 and -0.98 . For PBD, the values were the lowest (-0.39 and 0.55). Considering the phenolic compounds as independent variables and related to alkaloids, saponins, triterpenes, steroids and flavonoids, the highest coefficients (≥ 0.80) were recorded by total tannins, total phenols, total condensed tannins and condensed tannins bound to fiber. When the secondary metabolites were related to the primary metabolites (glucose, fructose, sucrose and N), coefficients were negative and varied between -0.41 and -0.98 . It can be concluded that the elements of the climate influenced the studied metabolites. All digestibility expressions were negatively affected by the presence of the secondary metabolites. Phenolic compounds were positively correlated with flavonoids, alkaloids, saponins, triterpenes and steroids, while primary metabolites correlated negatively with secondary metabolites. It is recommended to consider the results of this study in *Leucaena leucocephala* to assess the effect of climate change on the secondary metabolites, counteract the negative effect of these compounds on ruminant feeding systems, conduct future research to establish its maximum allowable value in the diet and apply the simulation and mathematical modeling to predict the performance of these substances in this and other plants.

Key words: *antinutritional factors, digestibility, legumes, temperature, rain*

Grasses, legumes, trees and shrubs play an important role in animal feeding due to the quality of biomass and because it is an alternative to reduce the use of concentrated feed due to its high prices (Díaz 2014

Se establecieron los coeficientes de correlación de Pearson entre los metabolitos secundarios de *Leucaena leucocephala* y algunos factores climáticos (temperatura máxima, mínima y media, lluvia y número de días con lluvia), los metabolitos primarios y las digestibilidades (materia orgánica, materia seca, proteína y FDN). Los metabolitos fueron A) secundarios: taninos totales, fenoles totales, taninos condensados totales, taninos condensados libres, alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides) y B) primarios: glucosa, fructosa, sacarosa y N. Los metabolitos secundarios se correlacionaron con la temperatura máxima y el mayor coeficiente ($r=0.78$) fue para los esteroides, similar resultado se obtuvo para los taninos condensados ligados a la fibra, pero con la temperatura mínima ($r=-0.90$). El mayor coeficiente para el número de días con lluvias se presentó en los flavonoides ($r=0.99$), mientras que para la lluvia total fue para los fenoles totales ($r=-0.90$). Los coeficientes de correlación entre los metabolitos secundarios y la DMO variaron entre -0.57 y -0.74 . Para la DIVMS fluctuaron entre -0.65 y -0.94 ; para FDN entre -0.91 y -0.98 , mientras que para la DPB fueron los menores (-0.39 y 0.55). Al considerar los compuestos fenólicos como variables independientes y relacionarlos con los alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides, los mayores coeficientes (≥ 0.80) lo registraron los taninos totales, fenoles totales, taninos condensados totales y taninos condensados ligados a la fibra. Al relacionar los metabolitos secundarios con los metabolitos primarios (glucosa, fructosa, sacarosa y N), los coeficientes fueron negativos y variaron entre -0.41 y -0.98 . Se concluye que los elementos del clima influyeron en los metabolitos estudiados. Todas las expresiones de digestibilidad se afectaron negativamente por la presencia de los metabolitos secundarios. Los compuestos fenólicos se correlacionaron positivamente con los flavonoides, alcaloides, saponinas, triterpenos y esteroides, mientras que los metabolitos primarios se correlacionaron negativamente con los metabolitos secundarios. Se recomienda considerar los resultados de este estudio en *Leucaena leucocephala* para valorar el efecto del cambio climático en los metabolitos secundarios; contrarrestar el efecto negativo de estos compuestos en los sistemas de alimentación de rumiantes; realizar investigaciones futuras que permitan establecer su valor máximo permisible en la dieta y aplicar la simulación y modelación matemática para predecir el comportamiento de estas sustancias en esta y otras plantas.

Palabras clave: *factores antinutricionales, digestibilidad, leguminosas, temperatura, lluvia*

Los pastos de gramíneas, leguminosas, árboles y arbustos desempeñan una función protagónica en la alimentación animal por la calidad de la biomasa así como alternativa para reducir el uso de los alimentos

and Friedrich 2014). However, it is necessary to master its chemical composition and its variation sources (Boufennara *et al.* 2012).

Among the tree legumes, *Leucaena leucocephala* has great diffusion in the tropics, due to the multiple advantages of its use. This allowed to establish utilization systems that favor milk and meat production, economically viable and environmentally friendly (Ruiz *et al.* 2008). However, most studies have focused their attention on the content of protein, fiber, minerals and digestibility (Wencomo and Ortiz 2012), while those related to secondary metabolites (Pedraza 2008) are scarce.

These secondary metabolites are composed by a wide range of chemical compounds (tannins, phenols, alkaloids, saponins, and some others) that can produce different effects on the growth and productivity of the animal, depending on its concentration and time of ingestion, among others factors (Semmar *et al.* 2011).

There is a large literature on the variation of the chemical composition of grasses and legumes with respect to the components of the management and it is frequent to have these results according to the weather season (dry and rainy season), age of regrowth and fertilization, among other aspects. However, this information is not extensive in legume secondary metabolites, and especially, in their relation to the factors that are part of the climate.

On the basis of these cited elements, the objective of this study was to establish the Pearson correlation coefficient between: a) secondary metabolites of *Leucaena leucocephala* and some climatic factors, b) different expressions of digestibility and c) primary metabolites, glucose, fructose, sucrose and N.

Materials and Methods

Location, soil and climate. The research was carried out in the experimental area of the Universidad de Granma, Cuba, in a brown soil with carbonate (Hernández *et al.* 1999), pH 6.2, P₂O₅, K₂O and N contents of 2.4, 33.4 and 3.0 mg/100g of soil, respectively, and 3.6 % of organic matter. The experiment lasted two years and the maximum, minimum and mean temperatures, rainfall and number of days with rain were quantified.

Procedure and sampling. *Leucaena leucocephala* with two years of established was used, in plots of 0.5 ha. Samplings was performed every 60, 120 and 180 d of regrowth in 10 random plants. In each plant, the animal browsing was simulated, considering leaves, petioles and stems with diameter inferior to two centimeters. All the material sampled at each plant was mixed until a homogeneous sample was obtained, and it was dried in a forced air circulation oven for 72 hours at 65 °C. The samples were milled to a particle size of 1 mm.

concentrados debido a sus altos precios (Díaz 2014 y Friedrich 2014). No obstante, es necesario dominar su composición química y sus fuentes de variación (Boufennara *et al.* 2012).

Entre las leguminosas arbóreas, *Leucaena leucocephala* tiene gran difusión en el trópico, debido a las múltiples ventajas de su utilización. Esto permitió establecer sistemas de utilización que favorecen la producción de leche y carne, económicamente viable y amigable con el medio ambiente (Ruiz *et al.* 2008). Sin embargo, la mayoría de los estudios han centrado su atención en el contenido de proteína, fibra, minerales y digestibilidad (Wencomo y Ortiz 2012), mientras que son escasos los relacionados con los metabolitos secundarios (Pedraza 2008).

Estos metabolitos secundarios están integrados por una amplia gama de compuestos químicos (taninos, fenoles, alcaloides y saponinas, entre otros) que pueden producir variados efectos en el crecimiento y productividad del animal, en dependencia de su concentración y del tiempo de ingestión, entre otros factores (Semmar *et al.* 2011).

Amplia es la literatura que señala la variación de la composición química, de las gramíneas y leguminosas, con respecto a los componentes del manejo y es frecuente que se presenten estos resultados de acuerdo con la estación climática (período lluvioso y poco lluvioso), edad de rebrote y fertilización, entre otros aspectos. Sin embargo, esta información no es vasta en los metabolitos secundarios de las leguminosas y, en especial, en su relación con los factores que integran el clima.

Sobre la base de estos elementos antes citados, el objetivo de este trabajo fue establecer el coeficiente de correlación de Pearson entre: a) los metabolitos secundarios de *Leucaena leucocephala* y algunos factores climáticos, b) las diferentes expresiones de digestibilidad y c) los metabolitos primarios, glucosa, fructosa, sacarosa y N.

Materiales y Métodos

Localización, suelo y clima. La investigación se realizó en el área experimental de la Universidad de Granma, Cuba, en suelo pardo con carbonato (Hernández *et al.* 1999), pH 6.2, contenidos de P₂O₅, K₂O y N de 2.4, 33.4 y 3.0 mg/100g de suelo, respectivamente, y 3.6 % de materia orgánica. El experimento tuvo dos años de duración y se cuantificaron las temperaturas máxima, mínima y media, lluvia y número de día con lluvia.

Procedimiento y muestreo. Se empleó la *Leucaena leucocephala* con dos años de establecida, en parcelas de 0.5 ha. Los muestreos se realizaron cada 60, 120 y 180 d de rebrote en 10 plantas al azar. En cada planta se simuló el ramoneo del animal, considerando las hojas, los pecíolos y los tallos con diámetro inferior a dos centímetros. Todo el material muestreado en cada planta se mezcló hasta obtener una muestra homogénea, se secó en estufa de circulación de aire forzado durante 72 horas a 65 °C. Las muestras se molinaron a tamaño

Chemical analysis of samples. The crude protein content (AOAC 2016) was determined. Phenols and total tannins were determined by the Folin-Ciocalteu method, before and after treatment of extracts with polyvinylpyrrolidone (Makkar *et al.* 1988). Condensed, free tannins and those bound to the fiber were quantified with the use of nbutanol/HCl/Fe³⁺ (Porter *et al.* 1985). Flavonoids were determined according to Bohm and Koupai-Abyazani (1994), saponins, according to Obadoni and Ochuko (2002), alkaloids as indicated by Muzquiz *et al.* (1994), triterpenes according to Jie-Ping and Chao-Hong (2006) and steroids using Galindo *et al.* (1989) method.

For quantifying sugars, a HPLC (WATERS) of 2410 refraction index detector, with the use of Empower Pro 2002 program. The isocratic chromatographic method was used (constant flow), from 1 mL/min with a mobile phase of water + sulfuric acid at 0.01 N and 50 °C of column temperature. The used column was BioRad Amino HPX-87M ionic exclusion of 300 mm x 7.8 mm.

The *in vitro* digestibility was quantified in the DaisyII® (ANKOM 2000) incubator. For *in situ* digestibility, the Mehrez and Ørskov (1977) method was used, with the use of three sheep provided with a permanent ruminal cannula. Bags (15 cm x 10 cm), with 45 µm of pore size, were used for incubations. At 72 h, bags were extracted, washed with cold water, dried in a forced air oven at 53 °C up to reaching a constant weight, and they were weighed. Residues were processed in the ANKOM (2000) fiber analyzer, for determining NDF and ADF digestibility. The N was determined (Kjeldhal method) in order to establish CP digestibility and organic matter was determined according to Aumont *et al.* (1995).

Statistical analysis. Pearson correlation coefficients (Visauta 2007) were determined among the secondary metabolites (total phenols, total tannins, fiber-bound condensed tannins, free condensed tannins) and: a) some climatic factors (maximum, minimum and mean temperature, number of days with rains and total rain) b) digestibility of OM, DM, CP and ADF and c) primary metabolites (glucose, fructose, sucrose and N). In addition, relationships among total phenols, total tannins, fiber-bound condensed tannins, free condensed tannins and alkaloids, saponins, triterpenes, steroids and flavonoids were established. There are only report about coefficients higher than ± 0.40, and 95 % of probability (Andrade *et al.* 2015).

Results

Secondary metabolites were positively correlated with maximum temperature (0.43-0.78), while this was negative (0.41-0.90) with minimum temperature and there was no correlation with the mean for total phenols, total tannins, fiber-bound condensed tannins,

de partícula de 1 mm.

Análisis químico de las muestras. Se determinó el contenido de proteína bruta (ADAC 2016); fenoles y taninos totales por el método de Folin-Ciocalteu, antes y después del tratamiento de los extractos con polivinilpirrolidona (Makkar *et al.* 1988); taninos condensados, libres y ligados a la fibra con la utilización de nbutanol/HCl/Fe³⁺ (Porter *et al.* 1985); flavonoides según Bohm y Koupai-Abyazani (1994); saponinas, de acuerdo con Obadoni y Ochuko (2002); alcaloides como lo señalan Muzquiz *et al.* (1994); triterpenos según Jie-Ping y Chao-Hong (2006) y esteroides mediante Galindo *et al.* (1989).

Para la cuantificación de los azúcares, se utilizó un HPLC (WATERS) de 2410 detector de índice de refracción, con la utilización del programa Empower Pro 2002. El método cromatográfico adoptado fue el isocrático (flujo constante), de 1 mL/min con fase móvil de agua + ácido sulfúrico 0.01 N y 50 °C de temperatura de columna. La columna utilizada fue exclusión iónica BioRad Amino HPX-87M de 300 mm x 7.8 mm.

La digestibilidad *in vitro* se cuantificó en el incubador DaisyII® (ANKOM 2000). Para la degradabilidad *in situ*, se utilizó el método de Mehrez y Ørskov (1977) con la utilización de tres ovejas provistas de cánula ruminal permanente. Se utilizaron bolsas (15 cm x 10 cm) para las incubaciones con 45 µm de tamaño de poro. A las 72 h, las bolsas se extrajeron, se lavaron con agua fría, se secaron en estufa de aire forzado a 53 °C hasta alcanzar peso constante y se pesaron. Los residuos se procesaron en el analizador de fibra ANKOM (2000) para determinar la digestibilidad de la FDN y FDA. Se determinó el N (método Kjeldhal) para establecer la digestibilidad de la PB y la de la materia orgánica se estableció según Aumont *et al.* (1995).

Análisis estadístico. Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (Visauta 2007) entre los metabolitos secundarios (fenoles totales, taninos totales, taninos condensados ligados a la fibra, taninos condensados libres) y: a) algunos factores climáticos (temperatura máxima, mínima y media, número de días con lluvias y lluvia total) b) las digestibilidades de la MO, MS, PB y FDN y c) los metabolitos primarios (glucosa, fructosa, sacarosa y N). Además, se establecieron las relaciones entre los fenoles totales, taninos totales, taninos condensados ligados a la fibra, taninos condensados libres y los alcaloides, saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides. Solo se informan los coeficientes mayores de ± 0.40, con probabilidad de 95 % (Andrade *et al.* 2015).

Resultados

Los metabolitos secundarios se correlacionaron positivamente con la temperatura máxima (0.43-0.78), mientras que esta fue negativa (0.41-0.90) con la temperatura mínima y no hubo correlación con la media para los fenoles totales, taninos totales, taninos condensados totales, taninos condensados ligados a la fibra, saponinas y triterpenos. El coeficiente de correlación fue positivo con el número de días con lluvias

free condensed tannins, saponins and triterpenes. The coefficient of correlation was positive with the number of days with rain and varied between 0.65 and 0.99, while with total rain, it was variable (table 1).

Total tannins and total phenols showed high and positive correlations with flavonoids, alkaloids, saponins, triterpenes and steroids, while for total condensed tannins, fiber-bound condensed tannins and free condensed tannins, the correlations were smaller (table 2).

Secondary metabolites were negatively correlated with the digestibilities of organic matter (OMD), *in vivo* dry matter (IVDDM), protein (DPC) and NDF (DNDF), but the highest amount was recorded in the latter, with

y varió entre 0.65 y 0.99, mientras que con la lluvia total fue variable (tabla 1).

Los taninos totales y fenoles totales mostraron altas y positivas correlaciones con los flavonoides, alcaloides, saponinas, triterpenos y esteroides, mientras que para los taninos condensados totales, taninos condensados ligados a la fibra y taninos condensados libres, las correlaciones tuvieron menor magnitud (tabla 2).

Los metabolitos secundarios se correlacionaron negativamente con las digestibilidades de la materia orgánica (DMO), *in vivo* de la materia seca (DIVMS), de la proteína (DPB) y de la FDN (DFDN), pero la mayor magnitud se registró en esta última con coeficientes de

Table 1. Relation between secondary metabolites and some weather factors

Secondary metabolite	Independent variable				
	Temperature, °C			Rains	
	Maximum	Minimum	Mean	# days	Total, mm
Total tannins	0.64***	-0.75***	-	0.88***	0.67***
Total phenols	0.64***	-0.73***	-	0.69***	-0.90***
Total condensed tannins	0.60***	-0.83***	-	0.81***	0.59***
Fiber-bound condensed tannins	0.53***	-0.90***	-	0.71***	0.48**
Free condensed tannins	0.43**	-0.41**	0.75***	0.65*	0.67***
Alkaloids	0.70***	-0.52***	-	0.98***	0.79***
Saponins	0.62***	-0.74***	-	0.90***	0.68***
Triterpenes	0.48**	-0.84***	-	0.78***	0.44**
Steroids	0.78***	-0.48**	0.42**	0.97***	0.77***
Flavonoids	0.70***	-0.49**	-	0.99***	0.81***

*P<0.05 **P<0.01 *** P<0.001

Table 2. Relation between phenolic compounds and flavonoids, alkaloids, saponins, triterpenes and steroids

Independent variable	Dependant variable				
	Flavonoids	Alkaloids	Saponins	Triterpenes	Steroids
Total tannins	0.93***	0.94***	0.99***	0.96***	0.94***
Total phenols	0.93***	0.95***	0.99***	0.96***	0.94***
Total condensed tannins	0.88**	0.89**	0.98**	0.97**	0.89**
Fiber-bound condensed tannins	0.79**	0.81**	0.95***	0.96***	0.81**
Free condensed tannins	0.57*	0.54*	-	-	0.50*

*P<0.05 **P<0.01 *** P<0.001

Table 3. Relation between secondary metabolites and digestibility

Independent variable	Dependant variable			
	OMD	IVDDM	CPD	NDFD
Total tannins	-0.71***	-0.80***	-0.39**	-0.94***
Total phenols	-0.71***	-0.81***	-0.40*	-0.95***
Total condensed tannins	-0.73***	-0.74***	-	-0.91***
Fiber-bound condensed tannins	-	-	-	-
Free condensed tannins	-	-0.65***	-0.53***	-0.47**
Alkaloids	-0.57***	-0.92***	-0.55***	-0.98***
Saponins	-0.70***	-0.81***	-0.41**	-0.95***
Triterpenes	-0.74***	-0.78***	-	-0.89***
Steroids	-0.65***	-0.94***	-0.46**	-0.98***
Flavonoids	-0.59***	-0.93***	-0.52***	-0.98***

*P<0.05 **P<0.01 *** P<0.001

coefficients of -0.98, except for free condensed tannins, where the coefficient was only -0.47 (table 3).

Negative correlations were found between secondary metabolites and primary metabolites glucose, fructose, sucrose and N. The highest coefficient was found for N and, in general, the lowest value was obtained for glucose (table 4).

-0.98, con excepción de los taninos condensados libres, donde el coeficiente fue solo de -0.47 (tabla 3).

Se encontraron correlaciones negativas entre los metabolitos secundarios y los metabolitos primarios glucosa, fructosa, sacarosa y N. El mayor coeficiente se encontró para el N y, en general, el menor valor se obtuvo para la glucosa (tabla 4).

Table 4. Relation between secondary metabolites and primary metabolites

Dependant variable	Independant variable			
	Glucose	Fructose	Sucrose	N
Total tannins	-0.66**	-0.90**	-0.70**	-0.98**
Total phenols	-0.68**	-0.88**	-0.72**	-0.92**
Total condensed tannins	-0.56*	-0.94**	-0.62**	-0.96**
Fiber-bound condensed tannins	-0.41*	-0.98**	-	-0.90**
Free condensed tannins	-0.89**	-	-0.86**	-
Alkaloids	-0.87**	-0.70**	-0.90**	-0.98**
Saponins	-0.68**	-0.84**	-0.72**	-0.99**
Triterpenes	-0.54**	-0.91**	-0.58*	-0.93**
Steroids	-0.83**	-0.72**	-0.86**	-0.96**
Flavonoids	-0.88**	-0.69**	-0.91**	-0.98**

* P<0.05 **P<0.01

Discussion

It is considered that there are approximately 24000 chemical compounds in the plant kingdom that have toxic and antinutritional effects, termed secondary metabolites. They are widely distributed and legumes contain many of these substances.

Nowadays, their functions in the vegetable kingdom are much more enlightened than they were ten years ago. They are referred to as a means of defense against herbivores, symbiosis regulators, seed germination controllers, allopathic effects, have a direct involvement in the plant-animal relationship, and contribute to the adaptation of plants to prevailing environmental conditions, among other several functions (Makkar *et al.* 2007).

In addition, it has been reported that there is a group of substances generated by natural metabolism of plant species and that, by different mechanisms, exert contrary effects to the optimal nutrition of the animals when they are consumed, due to their varied effects on digestive and metabolic processes (Pérez *et al.* 2013). However, it should not be forgotten that the designation that characterizes its antinutritional nature was adopted from the approach of resource for feeding herbivores, and not from the functions they fulfill in the plant tissues.

Everything seems to indicate that the increase of the maximum temperature favors the synthesis of secondary metabolites, like when the minimum temperature decreases. This could be related to their function as protective agents of plants against predators or negative weather conditions (Ryan *et al.*

Discusión

Se considera que existen, aproximadamente, 24000 compuestos químicos en el reino vegetal que tienen efectos tóxicos y antinutricionales, denominados metabolitos secundarios. Se encuentran ampliamente distribuidos y las leguminosas portan muchas de estas sustancias.

En la actualidad, sus funciones en el reino vegetal están mucho más esclarecidas que hace diez años. Se hallan referidas como un medio de defensa contra herbívoros, reguladores de la simbiosis, controladoras de la germinación de la semilla, efectos alelopáticos, intervienen directamente en la relación planta-animal y contribuyen a la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales imperantes, entre otras múltiples funciones (Makkar *et al.* 2007).

Además, se ha informado que existe un grupo de sustancias generadas por el metabolismo natural de las especies vegetales y que, por diferentes mecanismos, ejercen efectos contrarios a la óptima nutrición de los animales cuando las consumen, debido a sus variados efectos en los procesos digestivos y metabólicos (Pérez *et al.* 2013). Sin embargo, no se debe perder de vista que la denominación que caracteriza su naturaleza antinutricional se adoptó a partir del enfoque de recurso para la alimentación de herbívoros, y no de las funciones que cumplen en los tejidos de los vegetales.

Todo parece indicar que el incremento de la temperatura máxima favorece la síntesis de los metabolitos secundarios, al igual que cuando disminuye la temperatura mínima. Esto pudiera estar relacionado con el papel que ellos desempeñan como agentes

2010). This statement is confirmed by the results of this research, but it should be added that while the minimum temperatures are lower, the synthesis of these compounds is higher.

Biochemical and physiological processes, related to synthesis, transport and degradation of substances in plants, are influenced by the temperature in which they are developed, their relation with kinetics of biochemical reactions and the maintenance of membrane integrity (Murray and Keely 2009). This previous information is evidenced by the low correlation or its absence between secondary metabolites and mean temperature.

In Cuba, the temperature is characterized by a relative homogeneity in plain areas and variations associated to altitude. However, daily oscillations surpass the annual one and, therefore, the performance of minimum and maximum temperature gains importance, as well as the differentiation among the periods that characterize each season, regarding the performance of chemical compounds, especially of secondary metabolites of varieties and species.

Not all forage species have the same optimal value of temperature for fulfilling these functions. Ramírez (2010) reported that the optimal photosynthetic value for legumes is between 30 and 35 °C, with high sensitivity to low temperatures, which negative effects occur between 0 and 15 °C, although in some species, it starts from 20 °C, when humidity is not a limiting factor. The previous information is attributed to the low conversion of sugars in plant tissues due to the decrease of biosynthesis process and energy deficit due to the reduction of respiratory rate. This may be confirmed with the results presented in table 4, in which the correlations were negative between secondary and primary metabolites.

Conversion of solar energy into biomass by grasses and legumes is variable and depends on the metabolic pathways through which photosynthesis occur, so photosynthetic rate is a function of the available energy. In C_3 plants, subjected to high radiation intensities, the rate of net assimilation is affected and the state of light saturation is reached in their leaves at 300-400 J/m²/sec under controlled conditions. However, under normal exploitation conditions, upper leaves reduce radiation values to the rest of foliage and only a part of them reaches its photosynthetic potential.

Legumes are carriers of C_3 photosynthetic cycle, and this determines that its growth stage is slow, if it is compared to forage grasses of C_4 pathway. Therefore, there are not enough studies that establish that shrub legumes and trees are carriers of this photosynthetic cycle, despite of evidences proving that weather factors influence on their chemical composition, or others that relate the photosynthetic pathway with secondary metabolites.

protectores de las plantas contra depredadores o condiciones climáticas adversas (Ryan *et al.* 2010). Este criterio se reafirma con los resultados de la presente investigación, pero se debe adicionar que mientras menores sean las temperaturas mínimas, mayor es la síntesis de estos compuestos.

Los procesos bioquímicos y fisiológicos, relacionados con la síntesis, transporte y degradación de sustancias en las plantas, están influenciados por el régimen térmico en el que se desarrollan, el grado de relación que estas poseen con la cinética de las reacciones bioquímicas y el mantenimiento de la integridad de las membranas (Murray y Keely 2009). Lo anterior se evidencia en la baja correlación o ausencia de ella entre los metabolitos secundarios y la temperatura media.

En Cuba, el régimen térmico se caracteriza por relativa homogeneidad en las llanuras y variaciones asociadas a la altitud. Sin embargo, las oscilaciones diarias superan a la anual y, por tanto, resulta de interés el comportamiento de la temperatura máxima y mínima, así como la diferenciación entre los períodos que caracterizan cada etapa estacional, con respecto al comportamiento de los compuestos químicos, en especial de los metabolitos secundarios de las especies y variedades.

No todas las especies forrajeras tienen el mismo valor óptimo de temperatura para el cumplimiento de estas funciones. Ramírez (2010) informó que el óptimo fotosintético para las leguminosas se encuentra entre 30 y 35 °C, con alta sensibilidad a las bajas temperaturas, cuyos efectos negativos en el crecimiento ocurren entre 0 y 15 °C, aunque en algunas especies comienza a partir de 20 °C, si la humedad no es un factor limitante. Lo anterior se atribuye a la baja conversión de azúcares en los tejidos de las plantas, debido a la disminución de los procesos de biosíntesis y déficit energético por la reducción de la tasa respiratoria. Lo anterior se puede avalar con los resultados que se muestran en la tabla 4, donde las correlaciones fueron negativas entre los metabolitos secundarios y los primarios.

La conversión de energía solar en biomasa por las gramíneas y leguminosas es variable, y depende de las vías metabólicas mediante las que se efectúa la fotosíntesis, por lo que la tasa fotosintética es una función de la energía disponible. En las plantas C_3 , sometidas a altas intensidades de radiación, se afecta la tasa de asimilación neta y el estado de saturación lumínica se alcanza en sus hojas a 300-400 J/m²/seg en condiciones controladas. Sin embargo, en condiciones normales de explotación, las hojas superiores reducen los valores de radiación al resto del follaje y sólo una parte de ellas alcanza su potencial fotosintético.

Las leguminosas son portadoras del ciclo fotosintético C_3 y esto determina que su etapa de crecimiento inicial sea lenta, si se compara con las gramíneas forrajeras de sendero C_4 . De modo que no se han realizado suficientes estudios que establezcan que las leguminosas arbustivas y las plantas arbóreas sean portadoras del referido ciclo

The volume of water from precipitations and its distribution during the year have effect on growth and quality of forages due to their relation with biochemical and physiological factors that regulate these very complex biological processes. Water is an essential component of plant cells, and almost all metabolic processes depend on its presence. In addition, it is required for the maintenance of turgency pressure, diffusion of solutes in cells and provides hydrogen and oxygen, involved in the photosynthetic process. Therefore, it is important to consider the volume of precipitations and the time they occur.

Results of this research showed that, from the secondary metabolites point of view, it is more important the distribution of rains (number of days with rain) than their total volume. This could be related to the existence of enough amount of water that allows an appropriate cell turgency, adequate water balance and availability of nutrients in the cell, which favors the synthesis of secondary metabolites.

If secondary metabolites are found in certain concentrations in DM, when they are ingested by animals it may cause a negative effect on their physiology, neurological, reproductive and digestive disorders, mumps, gangrene and even death. Alkaloids, cyanogenic, glycosides, toxic amino acids and saponins, and some others, may cause these previous effects. If their concentration is superior to 2 % of DM, they may produce digestive disorders and in sensorial organs, related to feeding and decrease of the action of ruminal microorganisms on cell wall digestibility, among other effects. The metabolites that cause these effects are, mainly, tannins and amylase and protease inhibitors (Makkar *et al.* 2007 and Newell-McGloughlin 2008).

Hydrolysable tannins may cause gastric bleedings and damage kidneys. Condensed tannins are related to the best digestion of proteins in ruminants and may protect them against helminthiasis (Makkar 2003). In addition, Makkar *et al.* (2007) reported that secondary metabolites has gained importance in food for humans because of its potential for preventing cancer, circulatory disorders and viral infections, antioxidant and antibacterial effects, antiviral and antiparasitics, among other characteristics. However, their action mechanisms are not totally established.

Negative correlations reported in this study between secondary metabolites and the different expressions of digestibility reported that, as the content of secondary metabolites decreases, there are higher values of digestibility, especially in the digestibility of NDF. This could indicate a higher degradability of this fiber fraction and, therefore, a higher available energy. It is important to highlight that the one with the lowest influence was CP digestibility, which could be attributed to the protective effect of tannins.

Previously, the importance of primary metabolites

fotosintético, a pesar de existir evidencias de que los factores climáticos influyen en su composición química ni aquellos que relacionan la vía fotosintética con los metabolitos secundarios.

El volumen de agua caída por las precipitaciones y su distribución en el año ejercen efectos en el crecimiento y calidad de los forrajes, debido a su relación con los factores bioquímicos y fisiológicos que regulan estos procesos biológicos de gran complejidad. El agua es un componente esencial de las células de las plantas, casi todos los procesos metabólicos dependen de su presencia. Además, se requiere para el mantenimiento de la presión de turgencia, la difusión de solutos en las células y suministra el hidrógeno y oxígeno que están involucrados durante el proceso fotosintético. De ahí, la importancia de considerar no solo el volumen de las precipitaciones sino su distribución a través del tiempo.

Los resultados de esta investigación señalaron que desde el punto de vista de los metabolitos secundarios es más importante la distribución de las lluvias (número de días con lluvia) que el volumen total de ellas. Esto puede estar relacionado con la existencia de cantidad de agua suficiente, que permite la correcta turgencia celular, adecuado balance hídrico y disponibilidad de nutrientes en la célula, lo que propicia la síntesis de metabolitos secundarios.

Si los metabolitos secundarios se encuentran en determinadas concentraciones en la MS, al ser ingeridos por los animales pueden causar efecto negativo en su fisiologismo, trastornos neurológicos, reproductivos y digestivos, papera, gangrena e incluso la muerte. Entre los metabolitos causantes de estos efectos, se encuentran los alcaloides, glicósidos cianogénicos, aminoácidos tóxicos y saponinas, entre otros. Si su concentración es superior al 2 % de la MS, producen trastornos digestivos y en órganos sensoriales, relacionados con la alimentación y disminución de la acción de los microorganismos ruminales en la digestibilidad de la pared celular, entre otros. Los metabolitos causantes de estos efectos son, principalmente, los taninos y los inhibidores de proteasas y amilasas (Makkar *et al.* 2007 y Newell-McGloughlin 2008).

Los taninos hidrolizables pueden causar hemorragias gástricas y daños en los riñones. Los taninos condensados están relacionados con la mejor digestión de las proteínas en los rumiantes y los pueden proteger contra la helmintiasis (Makkar 2003). Además, Makkar *et al.* (2007) informaron que los metabolitos secundarios han despertado el interés en alimentos para consumo humano, debido a su potencial para prevenir cáncer, desórdenes circulatorios e infecciones virales, antioxidantes y efectos antibacterias, antiviral y antiparásitos, entre otras propiedades. Sin embargo, sus mecanismos de acción no están totalmente establecidos.

Las correlaciones negativas informadas en este trabajo entre los metabolitos secundarios y las diferentes expresiones de digestibilidad informaron que, mientras menor es el contenido de los primeros, mayores valores de digestibilidad se obtienen, en especial la digestibilidad de la FDN. Esto pudiera indicar mayor degradabilidad

was evident. In this study, there were negative correlations of secondary metabolites with glucose, fructose, sucrose and N. This could indicate that primary metabolites take part of the structure of secondary metabolites, like carbonated chains, and are involved in the synthesis of those metabolites as energy source. Therefore, these aspects are important because primary metabolites have an essential function in growth, development and reproduction of plants, which would imply changes in the different physiological processes, when the primary metabolites are used in the synthesis of secondary metabolites. Further studies are needed to confirm these elements.

In the consulted literature, there were no articles referring to the results presented in this study because, in general terms, the chemical composition of leucaena have been reported by season (rainy and dry period). There is a similar situation with secondary metabolites (Verdecia 2014). It was important the effect of minimum and maximum temperature, and the distribution of precipitations in secondary metabolites, as well as their negative action on different expressions of digestibility, but the lowest influence was for tannins and phenols in relation to CP digestibility and their relation to primary metabolites. This previous statement requires further studies to support and explain the obtained results.

It can be concluded that weather elements influenced on the studied metabolites. All digestibility expressions were negatively affected by the presence of secondary metabolites. Phenolic compounds were positively related to flavonoids, alkaloids, saponins, triterpenes and steroids, while primary metabolites were negatively correlated to secondary metabolites. It is suggested to consider the results of this study in *Leucaena leucocephala* to evaluate the effect of climate change on secondary metabolites and counteract the negative effect of these compounds on ruminant feeding systems. It is also recommended further researches that allow to establish their maximum permissible value in the diet and apply mathematical modelling and simulation to predict the performance of these substances in this and other plants.

Acknowledgements

Thanks to the Universidad de León, Spain for the cooperation in the chemical analysis of samples

de esta fracción fibrosa y, por lo tanto, mayor energía disponible. Llamó la atención que la menos influida fue la digestibilidad de la PB, lo que se pudiera atribuir al efecto protector de los taninos.

Con anterioridad se evidenció la importancia de los metabolitos primarios. En este estudio, se encontraron correlaciones negativas de los metabolitos secundarios con la glucosa, fructosa, sacarosa y N. Esto pudiera indicar que los metabolitos primarios forman parte de la estructura de los metabolitos secundarios, como son las cadenas carbonadas, y están involucrados en la síntesis de los referidos metabolitos como fuentes de energía. Por ello, se debe atender a estos aspectos, ya que los metabolitos primarios desempeñan una función fundamental en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas, lo que implicaría alteraciones en los diferentes procesos fisiológicos, al ser empleados los metabolitos primarios en la síntesis de los metabolitos secundarios. En estudios futuros estos elementos necesitan ser confirmados.

En la bibliografía consultada no se encontraron artículos que hicieran referencia a los resultados aquí presentados, ya que en términos generales la composición química de la leucaena se ha informado por período estacional (período lluvioso y poco lluvioso). Igual situación se ha notificado en relación con los metabolitos secundarios (Verdecia 2014). Importante fue el efecto de la temperatura máxima y mínima, y la distribución de las precipitaciones en los metabolitos secundarios, así como la acción negativa de ellos en las diferentes expresiones de digestibilidad, pero la menor influencia fue para los taninos y fenoles en relación con la digestibilidad de la PB, así como su relación con los metabolitos primarios. Lo anterior necesita investigaciones específicas futuras para avalar y explicar con mayor profundidad los resultados obtenidos.

Se concluye que los elementos del clima influyeron en los metabolitos estudiados. Todas las expresiones de digestibilidad se afectaron negativamente por la presencia de los metabolitos secundarios. Los compuestos fenólicos se correlacionaron positivamente con los flavonoides, alcaloides, saponinas, triterpenos y esteroides, mientras que los metabolitos primarios se correlacionaron negativamente con los metabolitos secundarios. Se recomienda considerar los resultados de este estudio en *Leucaena leucocephala* para valorar el efecto del cambio climático en los metabolitos secundarios y contrarrestar el efecto negativo de estos compuestos en los sistemas de alimentación de rumiantes. Se sugiere además, realizar investigaciones futuras que permitan establecer su valor máximo permisible en la dieta y aplicar la simulación y modelación matemática para predecir el comportamiento de estas sustancias en esta y otras plantas.

Agradecimientos

Los autores agradecen la Universidad de León, España por la colaboración en el análisis químico de las muestras

References

- Andrade, A. S., Santos, P. M., Pezzopane, J. R. M., Araujo, L. C., Pedreira, B. C., Pedreira, C. G. S., Marin, F. R. & Lara, M. a. S. 2015. "Simulating tropical forage growth and biomass accumulation: an overview of model development and application". *Grass and Forage Science*, 71(1): 54–65, ISSN: 1365-2494, DOI: 10.1111/gfs.12177.
- ANKOM. 2000. Procedures for fiber and *in vitro* analysis. Ankom Technology, Available: <<http://www.ankom.com>>, [Consulted: November 16, 2010].
- AOAC. 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].
- Aumont, G., Caudron, I., Saminadin, G. & Xande, A. 1995. "Sources of variation in nutritive values of tropical forages from the Caribbean". *Animal Feed Science and Technology*, 51(1–2): 1–13, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(94)00688-6.
- Bohm, B. A. & Koupai-Abyazani, M. R. 1994. "Flavonoids and Condensed Tannins from Leaves of Hawaiian *Vaccinium reticulatum* and *V. calycinum* (Ericaceae)". *Pacific Science*, 48(4): 458–463, ISSN: 0030-8870.
- Boufennara, S., López, S., Bousseboua, H., Bodas, R. & Bouazza, L. 2012. "Chemical composition and digestibility of some browse plant species collected from Algerian arid rangelands". *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10(1): 88–98, ISSN: 2171-9292, DOI: 10.5424/sjar/2012101-134-11.
- Díaz, T. 2014. "Contribution of livestock production to food and nutritional security and to the reduction of poverty in Latin America and the Caribbean". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(1): 3–4, ISSN: 2079-3480.
- Friedrich, T. 2014. "Production of animal origin feed. Current events and perspectives". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(1): 5–6, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueitio, E. & Larrahondo, J. 1989. "Sustancias antinutricionales en las hojas de árboles forrajeros". *Livestock Research for Rural Development*, 1(1): 36–47, ISSN: 0121-3784.
- Hernández, J. A., Pérez, J. M., Bosch, D., Rivero, L., Camacho, E., Ruiz, J., Salgado, E. J., Marsán, R., Obregón, A., Torres, J. M., Gonzáles, J. E., Orellana, R., Paneque, J., Ruiz, J. M., Mesa, A., Fuentes, E., Durán, J. L., Pena, J., Cid, G., Ponce de León, D., Hernández, M., Frómata, E., Fernández, L., Garcés, N., Morales, M., Suárez, E. & Martínez, E. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana, Cuba: AGROINFOR, 64 p., ISBN: 959-246-022-1.
- Jie-Ping, F. & Chao-Hong, H. 2006. "Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3): 950–956, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/j.jpba.2006.01.044.
- Makkar, H. P. S. 2003. "Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds". *Small Ruminant Research*, 49(3): 241–256, ISSN: 0921-4488, DOI: 10.1016/S0921-4488(03)00142-1.
- Makkar, H. P. S., Dawra, R. K. & Singh, B. 1988. "Determination of both tannin and protein in a tannin-protein complex". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(3): 523–525, ISSN: 0021-8561.
- Makkar, H. P. S., Sánchez, M. & Speedy, A. W. 2007. Feed supplementation blocks. (ser. FAO animal production and health paper, no. ser. 164), Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 248 p., ISBN: 978-92-5-105438-3.
- Mehrez, A. Z. & Ørskov, E. R. 1977. "A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen". *The Journal of Agricultural Science*, 88(3): 645–650, ISSN: 1469-5146, 0021-8596, DOI: 10.1017/S0021859600037321.
- Murray, R. K. & Keely, F. W. 2009. "La matriz extracelular". In: Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kellenly, P. J., Rodwell, V. W. & Weil, P. A., *Bioquímica ilustrada*, McGraw-Hill Interamericana, p. 527, Available: <<http://blogs.sld.cu/marionod/2010/08/12/robert-k-murray-bioquimica-ilustrada-de-harper-28e-mcgraw-hill-interamericana-editores-sa-de-cv-2009-capitulo-45-radicales-libres-y-nutrientes-antioxidantes/>>, [Consulted: April 2, 2017].
- Muzquiz, M., Cuadrado, C., Ayet, G., de la Cuadra, C., Burbano, C. & Osagie, A. 1994. "Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7): 1447–1450, ISSN: 0021-8561.
- Newell-McGloughlin, M. 2008. "Nutritionally Improved Agricultural Crops". *Plant Physiology*, 147(3): 939–953, ISSN: 1532-2548, DOI: 10.1104/pp.108.121947.
- Obadoni, B. O. & Ochuko, P. O. 2002. "Phytochemical Studies And Comparative Efficacy Of The Crude Extracts Of Some Haemostatic Plants In Edo And Delta States Of Nigeria". *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 8(2): 203–208, ISSN: 1118-0579, DOI: 10.4314/gjpas.v8i2.16033.
- Pedraza, O. R. M. 2008. "Metabolitos secundarios no fenólicos en el follaje de árboles y arbustos. Efecto en la fisiología digestiva de rumiantes". *Revista de Producción Animal*, 20: 97–101, ISSN: 0258-6010, 2224-7920.
- Pérez, A., Ibrahim, M., Villanueva, C., Skarpe, C. & Guerin, H. 2013. "Rasgos funcionales que determinan la calidad nutricional y preferencia de leñosas forrajeras en sistemas de alimentación ganadera en zonas seca". In: VII Congreso Latinoamericano de Sistemas Agroforestales para a Produção Pecuária Sustentável, Brasil, Available: <http://biblioteca.catie.ac.cr:5151/repositoriomap/bitstream/123456789/290/1/Perez_z_et_al_Rasgos.pdf>, [Consulted: April 1, 2015].
- Porter, L. J., Hrstich, L. N. & Chan, B. G. 1985. "The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin". *Phytochemistry*, 25(1): 223–230, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3.
- Ramírez, J. L. 2010. Rendimiento y valor nutritivo de cinco gramíneas en el Valle del Cauto. Ph.D. Thesis, Universidad de Granma, Granma, Cuba.
- Ruiz, T. E., Febles, G. J., Castillo, E., Jordán, H., Galindo, J. L., Chongo, B., Delgado, D., Mejias, R. A. & Crespo, G. J. 2008. Tecnología de producción animal mediante *Leucaena leucocephala* asociada con pastos en el 100% del área de la

- unidad ganadera. La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, 6 p., Available: <http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/112-leucaena.pdf>, [Consulted: April 2, 2017].
- Ryan, G. D., Rasmussen, S. & Newman, J. A. 2010. "Global Atmospheric Change and Trophic Interactions: Are There Any General Responses?". In: Baluška, F. & Ninkovic, V. (eds.), Plant Communication from an Ecological Perspective, (ser. Signaling and Communication in Plants), Springer Berlin Heidelberg, pp. 179–214, ISBN: 978-3-642-12161-6, DOI: 10.1007/978-3-642-12162-3_11, Available: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-12162-3_11>, [Consulted: April 2, 2017].
- Semmar, N., Noura, S. & Farman, M. 2011. "Variability and ecological significances of secondary metabolites in terrestrial biosystems". Environmental Research Journal, 5(2–3): 213–302, ISSN: 1994-5396.
- 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, Granma, Cuba.
- Visauta, V. B. 2007. Análisis estadístico con SPSS 14: estadística básica. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana, 281 p., ISBN: 978-84-481-5670-1.
- Wencomo, H. B. & Ortiz, R. 2012. "Comportamiento de la disponibilidad de biomasa y la composición química en 23 accesiones de *Leucaena spp.*". Pastos y Forrajes, 35(1): 43–56, ISSN: 0864-0394.

Received: January 10, 2017