

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Estadística

Doctorado en Estadística Multivariante Aplicada



**Avances en la Economía Circular del Ecuador. Una
estrategia para la sostenibilidad basada en Métodos
BIPLOT**

Autor:

Juan Diego Valenzuela Cobos

Directoras:

Dra. M. Purificación Galindo Villardón

Dra. M. Purificación Vicente Galindo

2023

Avances en la Economía Circular del Ecuador. Una estrategia para la sostenibilidad basada en Métodos BIPLLOT



DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Memoria que para optar al Grado de Doctor,
por el Departamento de Estadística de la
Universidad de Salamanca, presenta:

Juan Diego Valenzuela Cobos

Salamanca

2023



**DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

Purificación Galindo Villardón

Catedrática del Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca

Purificación Vicente Galindo

Profesora Titular del Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que **Don Juan Diego Valenzuela Cobos** ha realizado, en la Universidad de Salamanca, bajo su dirección, el trabajo **Avances en la Economía Circular del Ecuador. Una estrategia para la sostenibilidad basada en Métodos BIPLLOT**, para optar al título de Doctor en Estadística Multivariante Aplicada, autorizando expresamente su lectura y defensa.

Y para que conste, firman el presente certificado en Salamanca a 30 de Mayo de 2023.

Dra. Purificación Galindo Villardón

Dra. Purificación Vicente Galindo

Agradecimientos

A la Dra. Puri a quien considero, con admiración y cariño MI MENTORA. Su ejemplo, perseverancia, entrega a su hogar y a su trabajo me han inspirado a crecer en lo profesional pero aún más en el lado personal y humano.

Al Dr. Fabricio, MI LÍDER, quien ha trazado un camino significativo de evolución en cada uno de nosotros como académicos. Su confianza y apertura me han permitido seguir consolidando mi crecimiento profesional y humano. Siempre gracias por permitirme ser parte de su equipo y plasmar en cada desafío la huella de una formación de calidad.

A la Dra. Purificación Vicente, Directora del Programa de Doctorado, por todos sus consejos en el plano profesional que me ayudaron a culminar con éxito esta investigación

Al Dr. Enrique Vicente por sus invaluable enseñanzas en el plano personal.

A mi UMEMI que me ha ayudado a cumplir tantos objetivos profesionales.

A mi mamá, mi papá y mis hermanos.

Dedicatoria

A mi abuelita María
por siempre haberme
apoyado en toda
mi vida.

“LO LOGRAMOS”

Resumen

Esta investigación se enfoca principalmente en resolver dificultades que se generan en sectores productivos de gran trascendencia económica en el Ecuador como la industria alimenticia y la agricultura. Los principales productos de estos sectores como el cacao generan grandes ingresos que se reflejan en el PIB del Ecuador.

Adicionalmente, esta tesis impulsa la economía circular permitiendo el uso de grandes cantidades de residuos agroindustriales que se generan de las industrias cacaoteras del Ecuador. Los resultados obtenidos de esta tesis ha generado la publicación de 2 artículos científicos en revistas de alto impacto que han recalcado la importancia del uso de técnicas estadísticas multivariantes en la selección de los mejores productos alimenticios y agrícolas con los mayores valores biológicos, químicos y comerciales.

Las técnicas estadísticas multivariantes utilizadas como el PCA Biplot y el GGE Biplot permitieron determinar las mezclas de harinas alimenticias formuladas a base de residuos de cacao y otros desechos agrícolas con los mayores valores de proteína y fibra, y altos valores de actividades antioxidantes y antimicrobianas. Por otro lado, estos métodos estadísticos indicaron los biofungicidas agrícolas que tienen mayor efectividad contra las plagas que generan mermas en el cacao ecuatoriano.

Palabras claves: Cacao; economía; PCA Biplot; GGE Biplot; sectores productivos.

Índice General

CAPÍTULO I.....	2
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	2
1.1. Introducción.....	2
1.2. Formulación del problema.....	5
1.2.1. Sistematización:.....	5
1.3. Objetivos de la investigación.....	6
1.3.1. Objetivo general.....	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
1.4. Justificación de la investigación.....	6
1.5. Hipótesis de trabajo.....	7
1.6. Organización de la tesis doctoral.....	7
CAPÍTULO II.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Técnicas de Biplot.....	9
2.1.1. PCA Biplot.....	9
2.1.1.1. Interpolación de muestras.....	11
2.1.1.2. Predicción de ejes.....	12
2.1.1.3. Medida de ajuste para PCA Biplot.....	12
2.1.1.3.1. Predictividad de muestras.....	14
2.1.1.3.2. Predictividad de ejes.....	14
2.1.1.3.3. Calidad de la aproximación.....	15
2.1.2. GGE Biplot.....	15
2.1.2.1. Cálculo de los efectos principales de los genotipos (G) y los ambientes (E).....	16
2.1.2.1.1. Efecto principal del genotipo (G).....	16
2.1.2.1.2. Efecto principal del ambiente (E).....	16
2.1.2.2. Cálculo de la interacción genotipo-por-ambiente (G x E).....	17
2.1.2.3. Realiza un Análisis de Componentes Principales (PCA) de la matriz de datos.....	17
2.1.2.4. Construcción del GGE Biplot.....	18
2.1.3. Aplicaciones de técnicas de Biplot.....	19
CAPÍTULO III.....	22
3. ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD ALIMENTARIA EN ECUADOR: USANDO PCA BILOT Y GGE BILOT.....	22
3.1. Metodología.....	22
3.1.1. Diseño experimental.....	22

3.1.2.	Sustrato y suplementación	22
3.1.3.	Composición nutricional de las muestras	23
3.1.4.	Actividad antioxidante.....	23
3.1.5.	Actividad antimicrobiana	23
3.1.6.	Análisis estadístico multivariante.....	24
3.1.7.	PCA Biplot	24
3.1.8.	GGE Biplot.....	24
3.2.	Resultados y discusiones	25
3.2.1.	Técnicas Estadísticas Multivariantes para composición nutricional de mezclas de harinas	25
3.2.2.	Técnicas Estadísticas Multivariantes para propiedades comerciales de mezclas de harinas	29
CAPÍTULO IV		47
4.	BIOCONTROL ECOLÓGICO DE MONILIASIS EN CACAO ECUATORIANO: USANDO TÉCNICAS BILOT	47
4.1.	Metodología.....	47
4.1.1.	Cepas de hongos	47
4.1.2.	Preparación de mezclas de medios de cultivo	47
4.1.3.	Crecimiento micelial.....	48
4.1.4.	Capacidad antagónica.....	48
4.1.5.	Prueba Experimental.....	49
4.1.6.	Análisis Estadístico	50
4.1.7.	PCA Biplot	50
4.1.8.	GGE Biplot.....	51
4.2.	Resultados y discusiones	52
4.2.1.	PCA Biplot para características miceliales y capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp.....	52
4.2.2.	GGE Biplot para las características del micelio y la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp.....	55
4.2.3.	Respuestas de campo de <i>Trichoderma</i> spp. contra monialisis causada por <i>Moniliophthora perniciosa</i>	58
CAPÍTULO V.....		74
5.	TÉCNICAS ESTADÍSTICAS MULTIVARIANTES: NUEVO ENFOQUE PARA IDENTIFICAR LAS PROPIEDADES COMERCIALES DE MEZCLAS DE <i>LENTINULA EDODES</i> Y CÁSCARA DE CACAO	74
5.1.	Metodología.....	74
5.1.1.	Producción de cuerpos fructíferos	74
5.1.2.	Preparación de las mezclas	74

5.1.3.	Composición de las mezclas.....	75
5.1.4.	Composición química.....	75
5.1.5.	Propiedades comerciales.....	75
5.1.6.	Capacidad antioxidante.....	75
5.1.7.	Actividad antioxidante.....	76
5.1.8.	Prueba de análisis sensorial	76
5.1.9.	Análisis estadístico	76
5.1.10.	GGE Biplot.....	77
5.1.11.	PCA Biplot	77
5.2.	Resultados y discusiones	78
5.2.1.	Algoritmo Estadístico para características químicas de las mezclas de harinas	79
5.2.2.	Algoritmo Estadístico para propiedades comerciales de las mezclas de harinas	81
5.2.3.	Características sensoriales de las mezclas de harinas.....	83
	CONCLUSIONES.....	88
	RECOMENDACIONES	91
	BIBLIOGRAFÍAS.....	93

Índice de Figuras

Figura 1. Biplot idealizado de matriz de datos.	10
Figura 2. Diagrama que compara el modelo completo y el modelo GGE.....	16
Figura 3. (a) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a los valores nutricionales; (b) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a los valores nutricionales..	27
Figura 4. (a) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a valores nutricionales; (b) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a los valores nutricionales.	29
Figura 5. (a) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a propiedades comerciales; (b) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a propiedades comerciales.	31
Figura 6. (a) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a propiedades comerciales; (b) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a propiedades comerciales.	33
Figura 7. (a) PCA Biplot para características miceliales y capacidades antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. cultivadas en medio PDA., (b) PCA Biplot para características miceliales y capacidades antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. crecidas en medio EMA.....	54
Figura 8. (a) GGE Biplot para características miceliales y capacidades antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. cultivadas en placas con PDA. (b) GGE Biplot para características miceliales y capacidades antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. crecidas en placas con EMA. ...	57
Figura 9. (a) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a las características químicas, (b) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a las características químicas.....	80
Figura 10. (a) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a propiedades comerciales, (b) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a propiedades comerciales.....	83

Índice de Tablas

Tabla 1.	Efectos de los tratamientos con <i>Trichoderma</i> spp. contra la monialisis causada por <i>Moniliophthora perniciosa</i>	59
Tabla 2.	Evaluación de la calidad sensorial de las mezclas de harinas	85

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Porcentaje de carbohidratos de los hongos comestibles.....	23
Ecuación 2. Actividad captadora de radicales DPPH (RSA)	23
Ecuación 3. Modelo de Gompertz modificado.....	48
Ecuación 4. Crecimiento máximo.	48
Ecuación 6. Inhibición de patógenos.....	49
Ecuación 7. Incidencia sobre las mazorcas de cacao.....	50
Ecuación 8. Eficiencia del tratamiento.....	50
Ecuación 9. Porcentaje de carbohidratos en las mezclas.....	75
Ecuación 10. Actividad de eliminación de radicales DPPH (RSA).	75

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Los sectores productivos del Ecuador relacionados con la producción de alimentos y la agricultura, tienen una gran importancia económica para el país, pero en los últimos años las grandes empresas y pequeños agricultores han presentado importantes pérdidas, principalmente por la deficiencia en el manejo e interpretación de los datos biológicos y químicos que se generan en las diferentes etapas de los procesos. Las herramientas de Análisis de Datos utilizadas para capturar la información más relevante en estos sectores son muy básicas, y por tanto no son capaces de evidenciar las estructuras de covariación, ni las interacciones, entre los componentes biológicos y químicos, por el carácter multivariante que estos presentan. Por estas razones, es necesario estudiar modernas técnicas estadísticas de Análisis de Datos como los métodos Biplot cuyos resultados se asiente la toma de decisiones, que permitirán reducir pérdidas económicas en estos sectores que aportan al PIB del Ecuador.

La agricultura es una de las actividades más importantes de la economía ecuatoriana; mantiene una dinámica económica que abastece de materia prima a la industria y garantiza la seguridad y soberanía alimentaria del país (Notarnicola et al., 2017). Los principales productos agrícolas ecuatorianos de exportación son: banano, camarón y cacao, siendo Ecuador el principal líder en la producción del cacao fino de aroma denominado Cacao Arriba que es reconocido internacionalmente (Guillermo et al., 2018). Ecuador es el principal país en la exportación y comercialización de la variedad Arriba Nacional a nivel mundial; este cacao es conocido por su intenso aroma (Jensch et al., 2022). El cacao en Ecuador se caracteriza por un perfil floral, de grosella negra y especias, debido a la composición fitoquímica, la cual está influenciada por el origen botánico, el lugar de crecimiento, la época de sol y lluvia, los nutrientes del suelo, la maduración, y la cosecha (Evans, 2010; Kongor, et al., 2016). El clima y la geología de

las diferentes regiones del país son importantes para el crecimiento de este cacao (Moreno-Miranda et al., 2019). Los residuos de cacao (cáscara de mazorca de cacao) se han empleado principalmente para elaborar diferentes productos alimenticios, como galletas, pan sin gluten, bebidas funcionales, salchichas de cerdo, galletas, muffins de chocolate, carne cocida, aceite extra de oliva virgen, mermelada, bebidas lácteas, bebidas de yogur, bocadillos y bizcocho (Rojo-Poveda et al., 2020; Younes et al., 2022). Ecuador genera toneladas de residuos que provienen de la industria cacaotera, el principal subproducto es la cáscara de la mazorca de cacao, que representa el 75% del peso total del fruto (Lu et al., 2018; Valenzuela-Cobos et al., 2021). La relación de producción de cáscara de mazorca de cacao (CPH) es que por cada kilogramo de granos de cacao se obtienen 10 veces más CPH, y generalmente se utiliza como fertilizante, en la producción de jabón, como alimento para animales y en la producción de absorbentes para diferentes contaminantes como: metales pesados, colorantes, productos farmacéuticos y pesticidas (Olakunle et al., 2018; Tejada-Tovar et al., 2019). El uso de la cáscara de la mazorca de cacao en el Ecuador generalmente se utiliza como materia orgánica para diferentes cultivos, sin embargo, este proceso genera problemas ambientales tales como: contaminación del suelo producida por la generación de lixiviados con altas concentraciones de nitrógeno amoniacal debido a la lenta biodegradación de este subproducto (Chafra et al., 2016; De Luna et al., 2017). La cáscara de la mazorca de cacao (CPH) muestra el mayor contenido de proteínas que oscila entre 7 y 10 %, el contenido de cenizas en un rango desde 6,4 hasta 8,4 %, la fibra dietética total desde 36,6 hasta 56,1 %, los carbohidratos entre 32 y 47 %, la humedad desde 85 hasta 90,5 %, y además presenta bajo contenido en grasa entre 1,5 y 2% (Vriesmann et al., 2011; Mansur et al., 2014; Gyedu-Akoto et al., 2015). En la mayoría de los países en desarrollo, la CPH se utiliza como sustituto de la proteína animal debido al mayor costo de producción de carne de aves y ganado (Oduro-Mensah et al., 2020).

Por otro lado, la producción de hongos comestibles se ha convertido en una importante actividad que genera trabajo a pequeños agricultores. *Lentinula edodes* (shiitake) es el segundo hongo con mayor producción a nivel mundial, el shiitake representa alrededor del 22% de la producción total de hongos comestibles (Kumar et al., 2022). La forma tradicional de cultivo de *Lentinula edodes* es en troncos cortados de los árboles utilizando largos periodos de tiempo, provocando impactos negativos en el medio ambiente por la destrucción forestal de los árboles. El alto consumo de este hongo

comestible ha impulsado el desarrollo de tecnologías basadas en el aprovechamiento de residuos agrícolas con alto contenido en carbono y nitrógeno como sustratos en el cultivo de *Lentinula edodes*. Diferentes autores han demostrado que las cepas de *Lentinula edodes* cultivadas en grandes volúmenes de residuos agroindustriales generados en Ecuador como: hojas de plátano permiten obtener altos parámetros de productividad como: eficiencia biológica y tasas de producción (Cobos et al., 2021). Las propiedades nutricionales, farmacéuticas y organolépticas de *Lentinula edodes* están relacionadas con la composición de nutrientes del sustrato de cultivo y el tipo de suplementos agregados (Parola et al., 2017; Royse et al., 2017). Además, el hongo shiitake fresco presenta sustancias aromáticas, mejorando características sensoriales como el sabor, lo que permite obtener productos procesados a través de diferentes técnicas como: secado, hidrólisis enzimática y fermentación (Chen et al., 2021). Los estudios han demostrado la importancia de utilizar los hongos *Lentinula edodes* para enriquecer el valor nutricional de los productos alimenticios porque es apetecible y nutritivo. La proteína de *Lentinula edodes* está compuesta por todos los aminoácidos esenciales en proporciones ideales para la nutrición humana. Además, *Lentinula edodes* muestra una alta composición de carbohidratos complejos, vitaminas, minerales y una alta cantidad de oligoelementos que mejora la condición física y previene enfermedades (Xu et al., 2014). En consecuencia, los hongos *Lentinula edodes* se pueden mezclar con diversos tipos de productos o subproductos como los residuos de cacao para obtener alimentos complementarios con alto contenido nutricional. Los estudios han demostrado que las técnicas de minería de datos permiten obtener una visualización adecuada de los datos obtenidos de diferentes sectores productivos como la agricultura permitiendo lograr soluciones prácticas y efectivas (Guler et al., 2002; Guevara-Viejó et al., 2021b).

Las técnicas estadísticas multivariantes permiten el estudio, representación e interpretación de datos resultantes de la observación de más de dos variables estadísticas sobre una muestra de individuos; estas variables son homogéneas y están correlacionadas (Mora et al., 2016). Los métodos multivariantes permiten resolver problemas complejos que tienen diferentes variables y niveles de factores, entre las principales técnicas estadísticas tenemos: el PCA Biplot y GGE Biplot con sus respectivos análisis de clústers. Los Biplots permiten estudiar conjuntos de variables en una población de individuos y determinar conjuntos de datos con las mismas características mediante el uso de operaciones matemáticas derivadas de la geometría, cálculo matricial y distribuciones

multivariantes (Guevara-Viejó et al., 2022a). Estos métodos multivariantes permiten extraer nuevos componentes principales que tienen una mayor varianza en comparación con los componentes originales. Las nuevas variables son combinaciones lineales que se construyen en función de la variabilidad total que recogen de la muestra. Los métodos de componentes principales no requieren que los datos sean normales, sin embargo, los datos que muestran una distribución normal pueden brindar una mejor interpretación de los componentes principales (Rosal Chicas & Alberto, 2017).

La aplicación de técnicas de estadísticas multivariantes como: el PCA-Biplot y el GGE Biplot permite tomar correctas decisiones mediante el uso de clústers, e identificar los mejores alimentos y productos agrícolas que permiten reducir pérdidas en estos sectores de gran importancia para el país.

1.2. Formulación del problema

¿Es posible seleccionar los productos alimenticios o agrícolas con los mayores valores desde el punto de vista biológico, químico y comercial utilizando técnicas de estadísticas multivariantes?

1.2.1. Sistematización:

- ¿Son las técnicas de Biplot aquellas que tienen mejor eficiencia en el agrupamiento de datos biológicos, químicos y comerciales?
- ¿Es posible que los métodos de PCA Biplot y de GGE Biplot permitan determinar características biológicas o químicas específicas de productos alimentos o agrícolas?
- ¿Se pueden determinar los mejores productos alimenticios o agrícolas que son de gran utilidad en sectores productivos del Ecuador utilizando los métodos de PCA Biplot y GGE Biplot?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el uso del PCA Biplot y del GGE Biplot en la selección de productos alimenticios o agrícolas que son de gran utilidad en sectores productivos del Ecuador.

1.3.2. Objetivos específicos

- Realizar una exhaustiva revisión bibliográfica sobre el estado del arte de las técnicas multivariantes: PCA Biplot.
- Realizar una exhaustiva revisión bibliográfica sobre el estado del arte de las técnicas multivariantes: GGE Biplot.
- Generar las matrices de información de características biológicas, químicas y comerciales de productos de gran importancia económica en sectores productivos del Ecuador.
- Analizar la interrelación entre las diferentes características biológicas, químicas y comerciales de productos de gran importancia económica en sectores productivos del Ecuador.

1.4. Justificación de la investigación

Las técnicas estadísticas convencionales se han utilizado en el área de la biotecnología vegetal para mejorar diferentes propiedades comerciales, como el rendimiento y la tolerancia a estreses bióticos y abióticos; sin embargo, los métodos de reducción, como PCA Biplot y GGE Biplot, se centran en múltiples variables y las presentan en menos variables complejas (Niazian & Niedbała, 2020).

La ciencia de datos utiliza una serie de técnicas para analizar múltiples variables mientras proporciona información más precisa mediante el análisis de la estructura de los datos. Las técnicas de ciencia de datos más importantes son el modelado de aprendizaje automático, el procesamiento del lenguaje natural, el análisis de sentimientos, las redes neuronales o el análisis de aprendizaje profundo que se utilizan en análisis de regresión, clasificación, análisis de agrupamiento, reglas de asociación, análisis de series temporales, análisis de sentimientos, patrones de comportamiento, detección de

anomalías, análisis factorial, análisis de registros y aprendizaje profundo utilizando la estructura interna de los datos. Estos métodos numéricos pueden aplicarse a masas considerables de datos; permiten a los científicos de datos establecer relaciones entre los datos y detectar los más significativos (Sarker, 2021).

Esta investigación se basa en el uso del PCA-Biplot y del GGE Biplot, métodos estadísticos utilizados para la identificación de características específicas biológicas y químicas de diferentes productos alimenticios o que se pueden utilizar en el campo agrícola.

1.5. Hipótesis de trabajo

Si los métodos de estadística multivariantes permiten agrupar grandes cantidades de datos basados en características específicas, entonces será posible utilizar las técnicas multivariantes para seleccionar los productos alimenticios o agrícolas con los mayores valores desde el punto de vista biológico, químico y comercial.

1.6. Organización de la tesis doctoral

El Capítulo 1 muestra la Introducción, el Objetivo General, los Objetivos específicos, y la Hipótesis de la tesis doctoral.

El Capítulo 2 indica los métodos estadísticos multivariantes utilizados en la tesis doctoral: PCA Biplot y GGE Biplot.

El Capítulo 3 describe el Estudio de Sostenibilidad Alimentaria en Ecuador: usando PCA Biplot y GGE Biplot.

El Capítulo 4 evalúa el Biocontrol Ecológico de Moniliasis en Cacao Ecuatoriano: Usando Técnicas Biplot.

El Capítulo 5 presenta el estudio de las Técnicas Estadísticas Multivariantes: Nuevo Enfoque para identificar las Propiedades Comerciales de Mezclas de *Lentinula edodes* y Cáscara de Cacao.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Técnicas de Biplot

Los métodos Biplot son herramientas estadísticas multivariantes gráficas que muestran una aproximación bidimensional a una matriz de datos de observaciones y variables, de rango r ($r > 2$) y permite un examen visual de la estructura de los datos. Un solo gráfico multivariante puede representar las relaciones entre diferentes parámetros observados (datos clínicos patológicos, puntajes histopatológicos y constantes farmacocinéticas) y, al mismo tiempo, ilustrar las relaciones de las unidades experimentales como individuos y como grupos de tratamiento entre sí y para estos parámetros. La técnica, basada en una descomposición de valores singulares de la matriz de datos, permite la inspección visual de patrones existentes en los datos (relaciones, tendencias y conjuntos), así como correlaciones y varianzas aproximadas (Gabriel, 1971; Gabriel, 1972; Tejedor-Flores et al., 2017; Amor-Esteban et al., 2018; Carrasco et al., 2019; Frutos Bernal et al., 2020; Martínez-Regalado et al., 2021; Guevara-Viejó et al., 2022b).

2.1.1. PCA Biplot

PCA es una técnica estadística que transforma linealmente un conjunto de p variables en un conjunto con un número menor (p) de variables no correlacionadas que explican una parte sustancial de la información del conjunto original. Las p variables originales (X_1, \dots, X_p) se transforman en variables p (Y_1, \dots, Y_p), de modo que Y_1 es la que explica la mayor parte de la variabilidad total de los datos, Y_2 explica la segunda parcela más grande y pronto.

Los principales objetivos del análisis de componentes principales son: reducir la dimensionalidad de los datos, obtener combinaciones de variables interpretables y, finalmente, discriminar y comprender la estructura de correlación de las variables.

El análisis se realiza con el fin de resumir el patrón de correlación entre variables y en algunos casos es posible llegar a conjuntos de variables que no están correlacionadas, dando lugar así a una agrupación de las mismas. Algebraicamente, los componentes principales son

combinaciones lineales de variables originales. Geométricamente, los componentes principales son las coordenadas de los puntos de muestreo en un sistema de ejes obtenido al rotar el sistema original de ejes en la dirección de máxima variabilidad de los datos.

El PCA depende únicamente de la covarianza (Σ) o de la matriz de correlación (ρ) de X_1, \dots, X_p . No requiere ninguna suposición acerca de la forma de distribución multivariante de estas variables.

Zou & Hastie (2005) indicaron que el éxito del PCA se debe a las siguientes propiedades:

1) Las componentes principales capturan secuencialmente la máxima variabilidad entre las columnas de X , lo que garantiza que haya una mínima pérdida de información.

2) Las componentes principales son no correlacionadas, por lo que se puede hablar de una componente principal sin hacer referencia a otras. El PCA permite transformar las variables originales, en general correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando la interpretación de los datos. Sin embargo, el PCA sufre del hecho de que cada componente principal es una combinación lineal de todas las variables originales, por lo que es a menudo difícil interpretar los resultados.

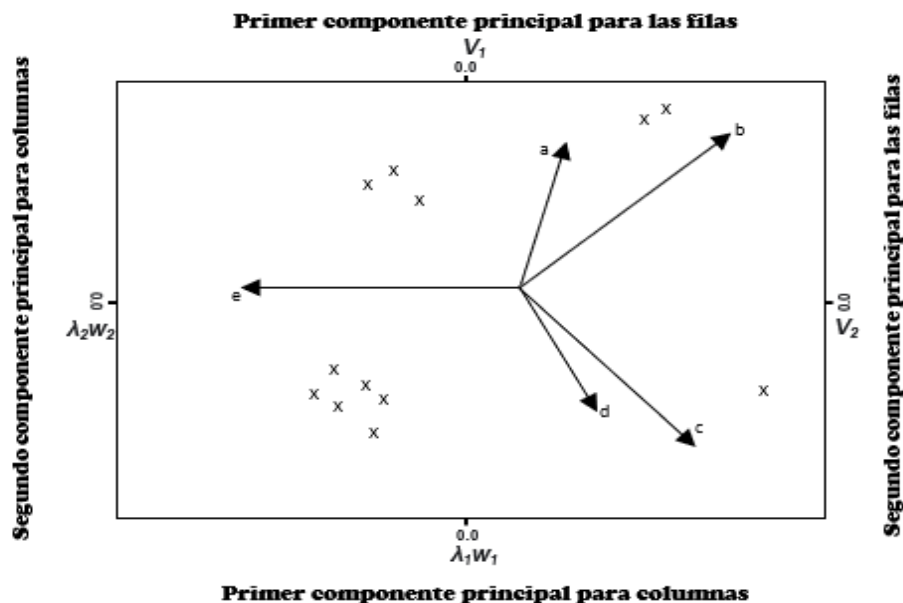


Figura 1. Biplot idealizado de matriz de datos.

2.1.1.1. Interpolación de muestras

En el PCA Biplot, la interpolación se logra proyectando ortogonalmente cada punto de muestra en el plano biplot (Gabriel, 1971; Galindo, 1986; Gower et al., 2011).

Supongamos \mathbf{d}_o que es una muestra centrada. Con $\mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{V}_{[r]} = \mathbf{I}_r \mathbf{Z} \mathbf{V}_{[r]}^T$ se puede escribir como:

$$\mathbf{Z} \mathbf{V}_{[r]}^T = \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T = \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} (\mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{V}_{[r]})^{-1} \mathbf{V}_{[r]}^T$$

La representación de la muestra \mathbf{d}_o proyectada en el plano Biplot es dado por:

$$\mathbf{d}_{o\text{proj}}^T = \mathbf{d}_o^T \mathbf{V}_{[r]} (\mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{V}_{[r]})^{-1} \mathbf{V}_{[r]}^T = \mathbf{z}^T \mathbf{V}_{[r]}^T$$

Como resultado, las coordenadas de las proyecciones de la muestra \mathbf{d}_o en el plano biplot están dadas por \mathbf{z}^T . Es decir, la muestra \mathbf{d}_o se interpola en el plano biplot por:

$$\mathbf{z}^T = \mathbf{d}_o^T \mathbf{V}_{[r]}$$

Considere un punto \mathbf{z}^* ($\mathbf{r} \times \mathbf{1}$) descrito en términos del sistema de coordenadas del plano biplot. Los puntos representan \mathbf{z}^* en el plano biplot también tiene una representación de coordenadas \mathbf{d}_o^* relativo a la ejes del espacio P-dimensional. Esto es cierto porque el plano biplot es un subespacio del espacio P-dimensional. Las coordenadas del punto en el espacio P-dimensional esta dado por $\mathbf{d}_{o\text{proj}}^*$ y las coordenadas del punto en el espacio r-dimensional están dadas por \mathbf{z}^* .

Así que cualquiera punto \mathbf{z}^* ($\mathbf{r} \times \mathbf{1}$) en términos de la base del plano biplot también es un punto $\mathbf{d}_{o\text{proj}}^*$ ($\mathbf{P} \times \mathbf{1}$) en términos de la base para el espacio P-dimensional de \mathbf{D}_o y tal punto se proyectará sobre sí mismo. Para ser preciso,

$$\mathbf{d}_{o\text{proj}}^T = \mathbf{d}_{o\text{proj}}^T \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T$$

Con la interpolación de un punto \mathbf{d}_o^* dada por $\mathbf{z}^{*T} = \mathbf{d}_o^{*T} \mathbf{V}_{[r]}$, $\mathbf{d}_{o\text{proj}}^T = \mathbf{z}^{*T} \mathbf{V}_{[r]}^T$. Por lo tanto, muestra \mathbf{d}_o^* es predicho por

$$\mathbf{d}_o^{*T} = \mathbf{z}^{*T} \mathbf{V}_{[r]}^T$$

2.1.1.2. Predicción de ejes

Los marcadores de columna para el PCA Biplot están definidos por las filas de la matriz $\mathbf{V}_{[r]}$. El eje del factor de calibración reemplazando \mathbf{b}_j por $\mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{e}_k$ dando el factor de calibración para el eje \mathbf{k}^{th} como:

$$\alpha = \frac{\mathbf{u}^*}{\mathbf{e}_k^T \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{e}_k}$$

Donde \mathbf{e}_k es el vector unitario con ceros excepto uno en la posición \mathbf{k}^{th} . Por lo tanto, el marcador \mathbf{u}^* sobre el eje de predicción Biplot se obtiene mediante la expresión:

$$\frac{\mathbf{u}^*}{\mathbf{e}_k^T \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{e}_k} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{e}_k$$

2.1.1.3. Medida de ajuste para PCA Biplot

Dado que se ha encontrado el mejor plano bidimensional en el que proyectar los puntos, tienen las coordenadas de los puntos cuando se proyectan en el plano, la calidad de la representación proporcionada por estas proyecciones es necesaria para determinar la idoneidad de la representación de los datos de la matriz original \mathbf{D}_o . En otras palabras, ¿qué tan cerca está $\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}$ de \mathbf{D}_o ? Para evaluar la calidad de la representación, considerar \mathbf{D}_o dividida en una parte ajustada $\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}$ y una parte residual $(\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]})$ (Oyedele & Lubbe, 2015). Es decir,

$$\mathbf{D}_o = \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]} + (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]})$$

La ecuación antes mencionada se puede considerar como una descomposición ortogonal \mathbf{D}_o , en que

$$\|\mathbf{D}_o\|^2 = \|\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}\|^2 + \|\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}\|^2$$

Ésta es la condición de ortogonalidad de la descomposición por suma de cuadrados, los dos tipos de ortogonalidad. Primero es

$$\mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T = \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]} \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}^T + (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}) (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]})^T$$

Esto se da por:

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_o (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]})^T &= \mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T - \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{D}_o^T \\ &= \mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T - \mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T \\ &= \mathbf{0} \end{aligned}$$

y

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_o (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]})^T &= \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{D}_o^T - \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{D}_o^T \\ &= \mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T - \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{D}_o^T \\ &= \mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T - \mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T \\ &= \mathbf{0} \end{aligned}$$

Para $\mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{V}_{[r]} = \mathbf{I}_r$ y $\mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T = \mathbf{I}_p$. El siguiente tipo ortogonal es:

$$\mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o = \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}^T \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]} + (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]})^T (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]})$$

donde

$$\begin{aligned} \mathbf{D}_o^T (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}) &= \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o - \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \\ &= \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o - \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o \\ &= \mathbf{0} \end{aligned}$$

y

$$\begin{aligned} \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}^T (\mathbf{D}_o - \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}) &= \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o - \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \\ &= \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o - \mathbf{V}_{[r]} \mathbf{V}_{[r]}^T \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o - \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o \\
 &= \mathbf{0}
 \end{aligned}$$

2.1.1.3.1. Predictividad de muestras

El grado en que las filas de $\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}$ concuerdan con las filas correspondientes de medidas \mathbf{D}_o a la distancia lejana cada muestra está de su aproximación dimensional (Gardner-Lubbe et al., 2008). Con la suma de cuadrados de los valores aproximados para cada muestra dados por los elementos diagonales de $(\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]} \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}^T)$, expresando estas sumas de cuadrados como una proporción de sus respectivas sumas de cuadrados totales, se obtiene el poder predictivo de cada muestra. Para ser preciso,

$$\text{Predictividad de muestras} = \text{diag} \left(\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]} \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}^T \right) [\text{diag} (\mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T)]^{-1}$$

Los valores de predicción de la muestra se encuentran entre 0 y 1, indicando que la muestra es ortogonal al plano de aproximación bidimensional biplot e implicando que la muestra está en el plano.

2.1.1.3.2. Predictividad de ejes

Se puede evaluar qué tan bien los ejes biplot individuales reproducen las variables de \mathbf{D}_o midiendo el grado en que las columnas de $\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}$ concuerdan con las columnas correspondientes de \mathbf{D}_o . Expresando la suma de cuadrados de los valores aproximados para cada variable, dada por $\text{diag} \left(\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]} \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}^T \right)$, como una proporción de su respectiva suma de cuadrados total produce la potencia predictiva de cada eje. Más precisamente,

$$\text{Predictividad de ejes} = \text{diag} \left(\widehat{\mathbf{D}}_{o[r]} \widehat{\mathbf{D}}_{o[r]}^T \right) [\text{diag} (\mathbf{D}_o \mathbf{D}_o^T)]^{-1}$$

Los valores de predictividad se encuentran entre 0 y 1. Un eje de predictividad de 1 significa que todos los valores pueden leerse exactamente fuera del eje. Cuanto menor sea el eje valor predictivo, con menor precisión el eje se aproxima a los valores observados bajo esa variable.

2.1.1.3.3. Calidad de la aproximación

En general, la calidad de la aproximación se puede medir en términos del porcentaje de variación en \mathbf{D}_o explicado por $\mathbf{Z} = \mathbf{D}_o \mathbf{V}_{[r]}$. Desde el SVD de \mathbf{D}_o , con $\mathbf{U}^T \mathbf{U} = \mathbf{I}_p$,

$$\mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o = (\mathbf{U} \mathbf{\Lambda} \mathbf{V}^T)^T (\mathbf{U} \mathbf{\Lambda} \mathbf{V}^T) = \mathbf{V} \mathbf{\Lambda} \mathbf{U}^T \mathbf{U} \mathbf{\Lambda} \mathbf{V}^T = \mathbf{V} \mathbf{\Lambda}^2 \mathbf{V}^T$$

Desde $\mathbf{V}^T \mathbf{V} = \mathbf{I}_p = \mathbf{V} \mathbf{V}^T$

$$\text{tr} \{ \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o \} = \text{tr} \{ \mathbf{V} \mathbf{\Lambda}^2 \mathbf{V}^T \} = \text{tr} \{ \mathbf{\Lambda}^2 \mathbf{V} \mathbf{V}^T \} = \sum_{j=1}^p \lambda_j^2 = \sum_{j=1}^p \sigma_j^2$$

dónde, $\mathbf{\Lambda} = \text{diag} (\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p)$, λ_j es el j^{th} valor singular de \mathbf{D}_o y $\sigma_j^2 = \lambda_j^2$ es el j^{th} valor propio (y valor singular) de $\text{cov} (\mathbf{D}_o)$. Por lo tanto,

$$\text{Calidad} = \frac{\text{tr} \{ \mathbf{D}_o^T_{[r]} \mathbf{D}_o_{[r]} \}}{\text{tr} \{ \mathbf{D}_o^T \mathbf{D}_o \}}$$

$$= \frac{\sum_{j=1}^r \lambda_j^2}{\sum_{j=1}^p \lambda_j^2}$$

$$= \frac{\sum_{j=1}^r \sigma_j^2}{\sum_{j=1}^p \sigma_j^2}$$

2.1.2. GGE Biplot

El GGE Biplot es una técnica utilizada en el análisis de datos multi ambientes para visualizar los efectos principales de los genotipos y la interacción genotipo-por-ambiente. Los estudios biológicos están relacionados con la variación fenotípica observada (P) que consiste en variaciones del ambiente (E), genotipo (G) y genotipo interacción ambiente (GEI) (Figura 2) (Yan & Kang, 2002).

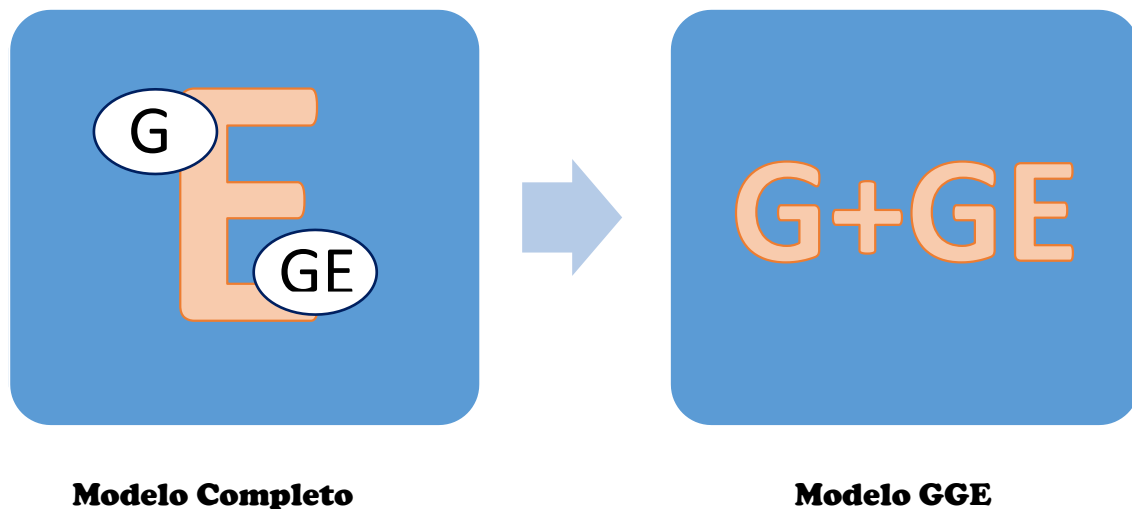


Figura 2. Diagrama que compara el modelo completo y el modelo GGE.

2.1.2.1. Cálculo de los efectos principales de los genotipos (G) y los ambientes (E)

2.1.2.1.1. Efecto principal del genotipo (G)

- Calcular el promedio de rendimiento para cada genotipo.
- Restar el promedio general de rendimiento (μ) a cada promedio de rendimiento del genotipo.
- El resultado es el efecto principal del genotipo.

$$G_i = \gamma_i - \mu$$

donde:

G_i es el efecto principal del genotipo i .

γ_i es el promedio de rendimiento del genotipo i .

μ es el promedio general de rendimiento.

2.1.2.1.2. Efecto principal del ambiente (E)

- Calcular el promedio de rendimiento para cada ambiente.
- Restar el promedio general de rendimiento (μ) a cada promedio de rendimiento del ambiente.
- El resultado es el efecto principal del ambiente.

$$E_j = \beta_j - \mu$$

donde:

E_j es el efecto principal del ambiente j.

β_j es el promedio de rendimiento del ambiente j.

μ es el promedio general de rendimiento

Estas fórmulas permiten calcular los efectos principales de los genotipos y los ambientes en un análisis G x E. Los valores resultantes reflejan las desviaciones de los promedios de rendimiento con respecto al promedio general de rendimiento, lo que proporciona información sobre la contribución individual de los genotipos y los ambientes al rendimiento observado.

2.1.2.2. Cálculo de la interacción genotipo-por-ambiente (G x E)

Calcular la desviación del rendimiento observado de cada combinación genotipo-ambiente con respecto a los efectos principales de los genotipos (G) y los ambientes (E). Esta desviación representa la interacción genotipo-por-ambiente (G x E).

$$G \times E_{ij} = \gamma_{ij} - \mu - G_i - E_j$$

donde:

$G \times E_{ij}$ es la interacción genotipo-por-ambiente para el genotipo i en el ambiente j.

γ_{ij} es el rendimiento observado del genotipo i en el ambiente j.

μ es el promedio general de rendimiento.

G_i es el efecto principal del genotipo i.

E_j es el efecto principal del ambiente j.

Es importante calcular y considerar la interacción genotipo-por-ambiente para comprender cómo los genotipos responden en diferentes ambientes. La interacción G x E revela patrones de rendimiento específicos que pueden ser cruciales para la toma de decisiones en la selección y recomendación de genotipos en diferentes condiciones ambientales.

2.1.2.3. Realiza un Análisis de Componentes Principales (PCA) de la matriz de datos

- Construir una matriz de datos utilizando los efectos principales de los genotipos (G), los efectos principales de los ambientes (E) y la interacción genotipo-por-ambiente (G x E).
- Realizar el PCA en la matriz de datos para obtener los componentes principales y sus correspondientes valores y vectores propios.

2.1.2.4. Construcción del GGE Biplot

- Utilizar los componentes principales y los vectores propios obtenidos en el PCA para construir el GGE Biplot.
- Representar los genotipos como puntos en el espacio de los componentes principales. Las coordenadas de cada genotipo en el biplot se calculan multiplicando los valores propios correspondientes por los vectores propios.
- Representar los ambientes como flechas o etiquetas en el biplot. Las coordenadas de cada ambiente en el biplot se calculan multiplicando los valores propios correspondientes por los vectores propios.
- El GGE Biplot permite visualizar las relaciones entre los genotipos y los ambientes en función de los componentes principales. Las distancias entre los genotipos y las direcciones de las flechas de los ambientes en el biplot proporcionan información sobre el rendimiento y la adaptabilidad de los genotipos en diferentes ambientes.

La ecuación:

$$Y_{ij} - \mu - \beta_j = G_{1i} e_{1j} + G_{2i} e_{2j} + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} : Representa el valor observado para la combinación del genotipo i y el ambiente j .

μ : Es la media general de todos los valores observados. Se utiliza como un término constante para centrar los datos alrededor de cero.

β_j : Representa el efecto principal del ambiente j . Este término captura el impacto promedio del ambiente en la respuesta observada.

$G_{1i} e_{1j}$ y $G_{2i} e_{2j}$: Estos términos representan los componentes principales del genotipo i y el ambiente j , respectivamente. Los componentes principales se obtienen mediante técnicas de análisis de componentes principales (PCA) aplicadas a los datos.

ϵ_{ij} : Es el término de error o residuo asociado a la observación Y_{ij} . Representa la variabilidad no explicada por los efectos principales y la interacción.

Se parte de un modelo general:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_j + G_i + E_j + \epsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} es el valor observado.

μ es la media general.

β_j es el efecto principal del ambiente j .

G_i es el efecto principal del genotipo i .

E_j es la interacción genotipo-por-ambiente.

ϵ_{ij} es el término de error o residuo.

Se realiza una simplificación asumiendo que la interacción genotipo-por-ambiente puede descomponerse en dos términos multiplicativos:

$$E_j = G_{1i} e_{1j} + G_{2i} e_{2j}$$

donde:

G_{1i} y G_{2i} representan los componentes principales del genotipo i .

e_{1j} y e_{2j} representan los componentes principales del ambiente j .

Se sustituye la ecuación simplificada de la interacción en el modelo general:

$$Y_{ij} - \mu - \beta_j = G_{1i} e_{1j} + G_{2i} e_{2j} + \epsilon_{ij}$$

La ecuación se obtiene al descomponer la respuesta observada en términos de los efectos principales de los genotipos, los efectos principales de los ambientes y el término de error.

La simplificación se realiza asumiendo que la interacción genotipo-por-ambiente puede descomponerse en dos términos multiplicativos. Los valores de los efectos principales y los componentes principales se estiman mediante el análisis de varianza (ANOVA) o modelos lineales, aplicados a los datos experimentales.

2.1.3. Aplicaciones de técnicas de Biplot

Las técnicas Biplot han sido utilizadas en diferentes campos para la toma correcta de decisiones. A continuación se presentan los usos actuales que han tenido estas técnicas.

Afzal et al. (2022) analizaron 12 genotipos de habas bajo 2 niveles de estrés salino (100 mM y 200 mM) y un control y los resultados se analizaron usando el gráfico de PCA Biplot. Los tres primeros componentes principales (PCs) representan el 81,45% de la varianza entre los rasgos estudiados. Las características más significativas que más contribuyeron a la diversidad fueron (pH, área foliar, número de vainas/plantas, número de semillas/vainas y contenido total de clorofila); sin embargo, los genotipos significativos (Hassawi-2, Sakha, ILB-4347, Misr-3, FLIP12501FB) estuvieron presentes en PC1 en ambas condiciones. Los resultados predijeron que Hassawi-2, ILB-4347, Sakha, Misr-3 y Flip12501FB eran los genotipos más tolerantes.

Ansarifa et al. (2020) examinaron y evaluaron la estabilidad y adaptabilidad del rendimiento de grano de doce genotipos de girasol en cinco regiones, incluidas Karaj, Birjand,

Firooz-Abad, Kashmar y Arak durante dos años. La investigación presentó tres genotipos principales y también tres megaambientes. El primer megaentorno incluía Karaj, Birjand y Kashmar. El segundo fue Arak, y el tercero Firooz-Abad. La vista de coordenadas promedio de los ambientes determinó que el genotipo Zaria presentó el mayor rendimiento de grano y la más alta estabilidad en rendimiento con 3,34 t/ha seguido de Favorite con 3,23 t/ha. Los resultados obtenidos al clasificar los entornos en función del entorno ideal presentaron las regiones de Kashmar y Birjand como los mejores entornos.

Shojaei et al. (2022) evaluaron 12 híbridos de maíz para determinar el efecto del genotipo y la interacción genotipo-ambiente utilizando la técnica GGE Biplot en cuatro estaciones de investigación (Arak, Birjand, Shiraz y Karaj). El gráfico biplot presentó la correlación entre los genotipos y clasificó los híbridos estudiados en cuatro grupos relacionados positivamente entre sí en función de los ángulos entre los vectores. Los genotipos KSC704 y KSC707 fueron deseables en rendimiento en Shiraz y Karaj y KSC706 en Arak y Birjand.

Sharma et al. (2023) utilizaron métodos convencionales y técnicas gráficas como: PCA Biplot y GGE Biplot para identificar el rendimiento de semilla de guisante de campo. Las dos metodologías convencional y de Biplot presentaron similares resultados: el híbrido HFP 715 × GP02/1108 presentó el mayor rendimiento, seguidos de los siguientes híbridos IPF 14-16 × GP02/1108, IPF 14-16 × HFP 1426, DDR-23 × HFP 1426, DDR-23 × GP02/1108, y Aman × GP02/1108.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD ALIMENTARIA EN ECUADOR: USANDO PCA BIPLOT Y GGE BILOT

CAPÍTULO III

3. ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD ALIMENTARIA EN ECUADOR: USANDO PCA BILOT Y GGE BILOT

3.1. Metodología

Los datos utilizados en este artículo científico se obtuvieron de forma experimental por el autor de esta tesis y con los técnicos de la Empresa Ecuahidrolizados S.A.S.

3.1.1. Diseño experimental

Se cosechó manualmente cáscaras de cacao en 50 fincas ubicadas en la Provincia del Guayas y se compraron 5 sacos de 10 kg de soya (marca VARGAS) en la Central de Abasto “Montebello” en Guayaquil, Ecuador. Las cáscaras de los granos de cacao y las semillas de soya se expusieron directamente a la luz solar hasta que se secaron, luego se molieron en un molino de cuchillas durante 30 s y se pasaron a través de una malla de 417 μm (Botella-Martínez et al., 2021).

Las características edafoclimáticas de la Provincia del Guayas son: temperatura máxima de hasta 35 °C, temperatura mínima de 16 °C, humedad relativa del 89% y temperatura anual precipitación de 810,2 mm.

3.1.2. Sustrato y suplementación

Las mezclas se realizaron utilizando las siguientes composiciones:

- Mezcla 1 (M1): 85% harina de cáscara de grano de cacao cosechada en finca mezclada con 15% harina de soya;
- Mezcla 2 (M2): 75% harina de cáscara de grano de cacao cosechada en finca mezclada con 25% harina de soya.

Las proporciones de cáscara de granos de cacao (75% y 85%) utilizadas en esta investigación es debido a que investigadores reportaron que las propiedades organolépticas son altas cuando se incrementa el contenido de cáscara de granos de cacao aumentado (Handojo & Indarto, 2020).

3.1.3. Composición nutricional de las muestras

La composición nutricional de las mezclas se analizó mediante procedimientos de la AOAC, analizando proteínas, grasas, carbohidratos, cenizas y fibra dietética total (FDT). El contenido de proteína ($N \times 6.25$) se estimó mediante el método de Kjeldahl.

El contenido de grasa se determinó mediante técnica de Soxhlet adaptando un matraz con hexano al portacartuchos (3 g) y condensador, y la extracción se realizó durante 4 h. Una vez finalizada la extracción, se eliminó el solvente por evaporación en un rotavapor. La grasa se enfrió en un desecador y se pesó.

Para determinar el contenido de cenizas, se pesó la muestra (0,5 g) en un crisol de porcelana. Posteriormente, la muestra se calentó en un mechero hasta su total calcinación. A continuación, el crisol con la muestra se colocó en una mufla a una temperatura de 600 °C durante 30 min.

Los carbohidratos (%C) se determinaron utilizando la Ecuación (1) (Guevara-Viejó et al., 2021a):

$$C(\%) = 100 - (\%humedad + \%proteina + \%grasa + \%cenizas) \quad (1)$$

Ecuación 1. Porcentaje de carbohidratos de los hongos comestibles.

3.1.4. Actividad antioxidante

Los valores de actividad antioxidante se obtuvieron usando un ensayo DPPH. En primer lugar, se mezclaron 30 µL del extracto y 270 µL de metanol (radicales DPPH) en una placa de 96 pocillos. La reacción se incubó en la oscuridad durante 30 min y la absorción se midió a 515 nm (Kostic et al., 2017). El ensayo de DPPH se calculó según un porcentaje de decoloración de DPPH utilizando la Ecuación (2):

$$RSA(\%) = \frac{ADPPH - AS}{ADPPH} \times 100 \quad (2)$$

Ecuación 2. Actividad captadora de radicales DPPH (RSA)

3.1.5. Actividad antimicrobiana

La evaluación de esta actividad se realizó utilizando la bacteria *Staphylococcus aureus* (ABP 784).

Las suspensiones bacterianas se ajustaron con solución salina estéril a una

concentración de $1,0 \times 10^6$ CFU/mL. Los extractos de las mezclas se disolvieron en etanol al 30% y se mezclaron con medios nutritivos para bacterias con $1,0 \times 10^5$ UFC por pocillo de Caldo Tryptic Soy en un volumen final de 100 μ L (Tsukatani et al., 2012).

3.1.6. Análisis estadístico multivariante

Las técnicas estadísticas multivariantes, como PCA Biplot y GGE Biplot, se realizaron utilizando el software R versión 4.1.1. (R Core Team, Viena, Austria).

3.1.7. PCA Biplot

Sustituyendo $\hat{\mathbf{D}}_{\mathbf{o}[\mathbf{r}]} = \mathbf{Z}\mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T$ obtenemos (Gabriel, 1971; Galindo, 1986; Gower, 2011):

$$\mathbf{Z}\mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T = \mathbf{D}_{\mathbf{o}}\mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T = \mathbf{D}_{\mathbf{o}}\mathbf{V}_{[\mathbf{r}]} (\mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T \mathbf{V}_{[\mathbf{r}]})^{-1} \mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T$$

La representación de la muestra proyectada en el plano biplot viene dada por:

$$\mathbf{d}_{\mathbf{o}proj}^T = \mathbf{d}_{\mathbf{o}}^T \mathbf{V}_{[\mathbf{r}]} (\mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T \mathbf{V}_{[\mathbf{r}]})^{-1} \mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T = \mathbf{z}^T \mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T$$

Las coordenadas hacen proyecciones en el plano biplot, que están dadas por \mathbf{z}^T . Es decir, la muestra se interpola en el plano biplot por:

$$\mathbf{z}^T = \mathbf{d}_{\mathbf{o}}^T \mathbf{V}_{[\mathbf{r}]}^T$$

3.1.8. GGE Biplot

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + l_k + (k) + t_{lik} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} se refiere a la observación obtenida en el i -ésimo genotipo, evaluado en la j -ésima repetición, en la k -ésima ubicación (Yan et al., 2000);

μ es la media general;

t_i se refiere al efecto fijo del i -ésimo genotipo utilizado en los ensayos, con $i = 1, 2, \dots$ veinte;

l_k es el efecto aleatorio de la k -ésima localidad, con $k = 1, 2, \dots, 7$;

(k) es el efecto aleatorio de la j -ésima repetición dentro de la k -ésima localidad, con $j = 1, 2, 3$;

t_{lik} es el efecto aleatorio de la interacción entre el i -ésimo genotipo con la k -ésima localidad;

ϵ_{ijk} es el error asociado con la observación Y_{ijk} .

3.2. Resultados y discusiones

El objetivo principal del estudio fue presentar el uso de dos mezclas de cáscara de cacao con harina de soya para la producción de nuevos alimentos mediante el análisis de diferentes propiedades nutricionales y comerciales, tales como humedad, proteína, grasa, carbohidrato, ceniza, fibra dietética total (FDT), y actividad biológica.

Las muestras de las mezclas de cáscara de cacao y harina de soya se realizaron utilizando la siguiente distribución:

1–50: Muestras de harina correspondientes a la Mezcla 1 (85 % de cáscara de cacao en grano cosechada en una granja, mezclada con 15 % de harina de soya);

51–100: Muestras de harina correspondientes a la Mezcla 2 (75 % de cáscara de grano de cacao cosechada en una granja, mezclada con 25 % de harina de soya).

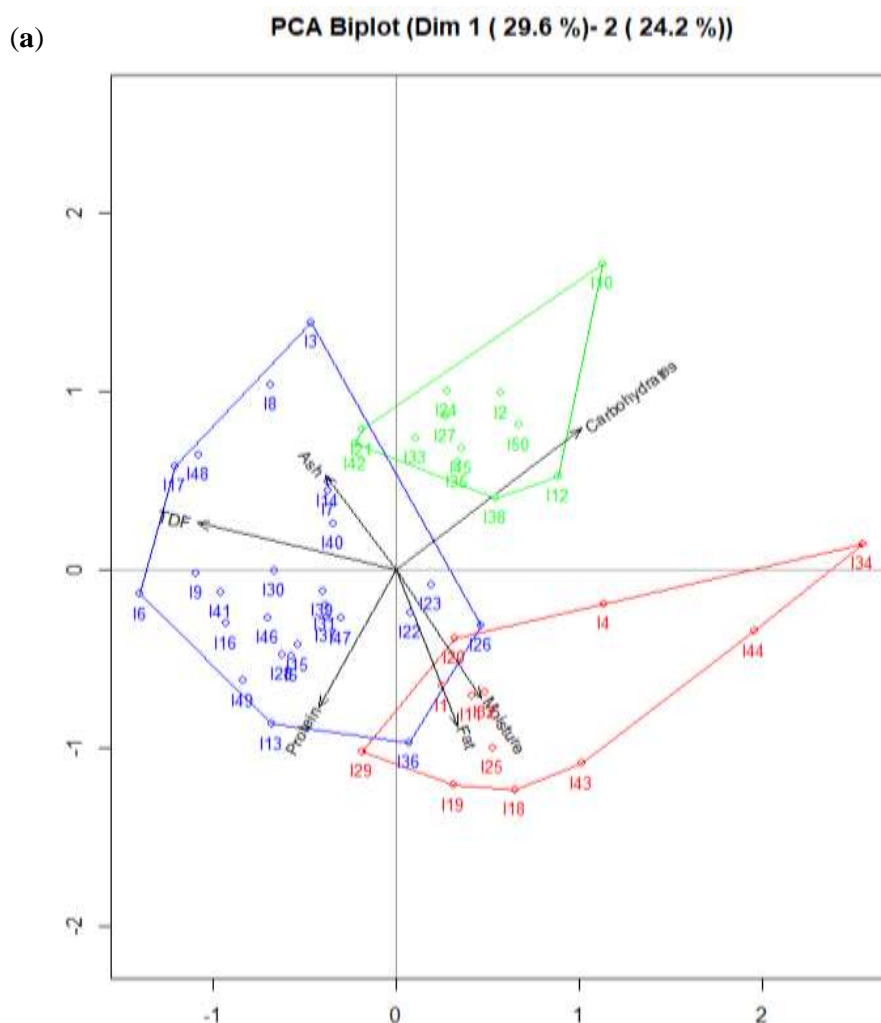
3.2.1. Técnicas Estadísticas Multivariantes para composición nutricional de mezclas de harinas

Los parámetros nutricionales de las mezclas de cáscaras de cacao y harina de soya nos permiten mostrar la importancia de los subproductos en beneficios para la salud. La Figura 3 presenta el plano 1-2 (PCA Biplot). Figura 3a indica que la inercia acumulada asciende al 53,8 %, mientras que el Figura 3b muestra que la inercia acumulada asciende al 54 %. Estas figuras presentan 50 muestras de harina correspondientes a la Mezcla 1 o Mezcla 2 con seis variables (humedad, proteína, lípidos, carbohidratos, cenizas y fibra dietética total “FDT”) utilizando el software RStudio.

La Figura 3a muestra tres clústers correspondientes a los valores nutricionales de las muestras de harina de la Mezcla 1, mientras que en la Figura 3b presenta los tres clústers que corresponden a los parámetros nutricionales de las muestras de harina de la Mezcla 2. El método de clúster permite la identificación y localización de similares

muestras en los datos reportados en pequeñas unidades de área. La distribución estadística utilizando clústers indica la significación estadística entre los individuos (Morphet, 1997).

El tamaño de cada clúster está relacionado con el número de puntos de datos. Para la Figura 3a: el clúster 1 (puntos azules) fue de 27 muestras, el clúster 2 (puntos verdes) fue de 12 muestras y el clúster 3 (puntos rojos) fue de 11 muestras. Las muestras pertenecientes a la Mezcla 1 (clúster 1) presentaron los valores más altos de parámetros nutricionales. Además, para la Figura 3b: el clúster 1 (puntos azules) fue de 14 muestras, el clúster 2 (puntos verdes) fue de 19 muestras y el clúster 3 (puntos rojos) fue de 17 muestras. Las muestras pertenecientes a la Mezcla 2 (clúster 1) presentaron los valores nutricionales más altos. Los puntos de datos presentan una distribución normal y los clústers varían en tamaño con el número de puntos de datos. Las muestras de harina correspondientes a la Mezcla 1 presentaron los parámetros nutricionales más altos en comparación con las muestras de harina correspondientes a la Mezcla 2.



(b)

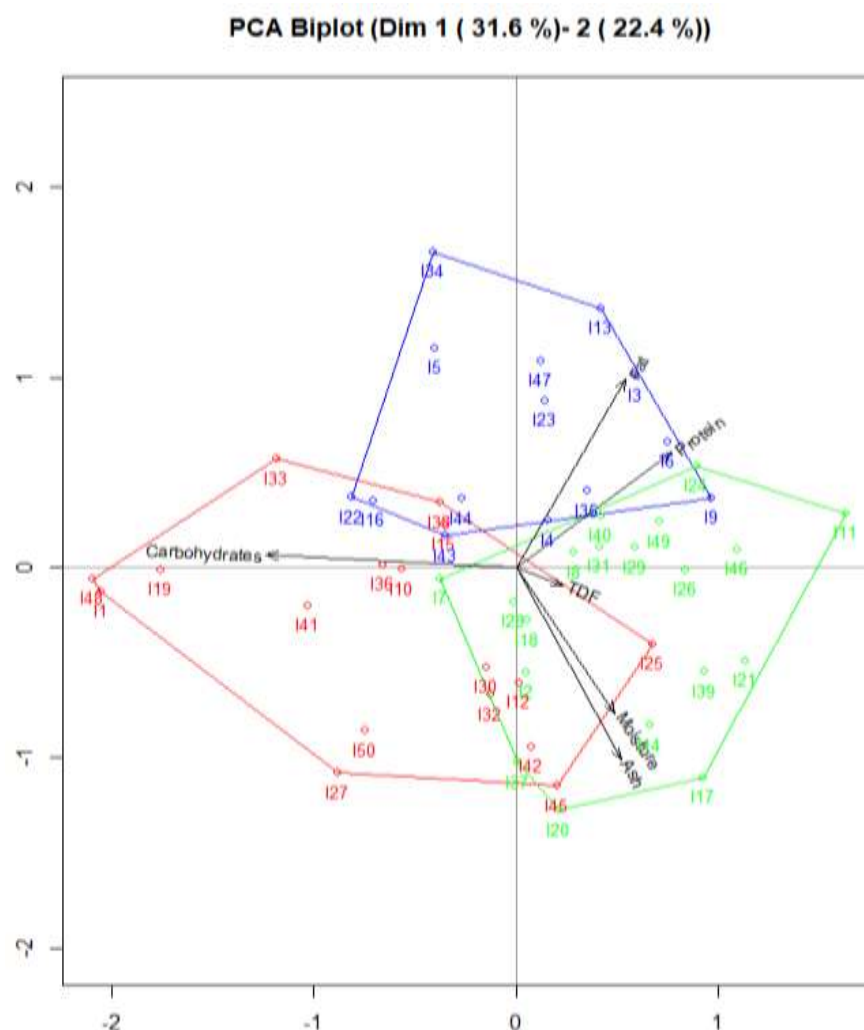


Figura 3. (a) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a los valores nutricionales; (b) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a los valores nutricionales..

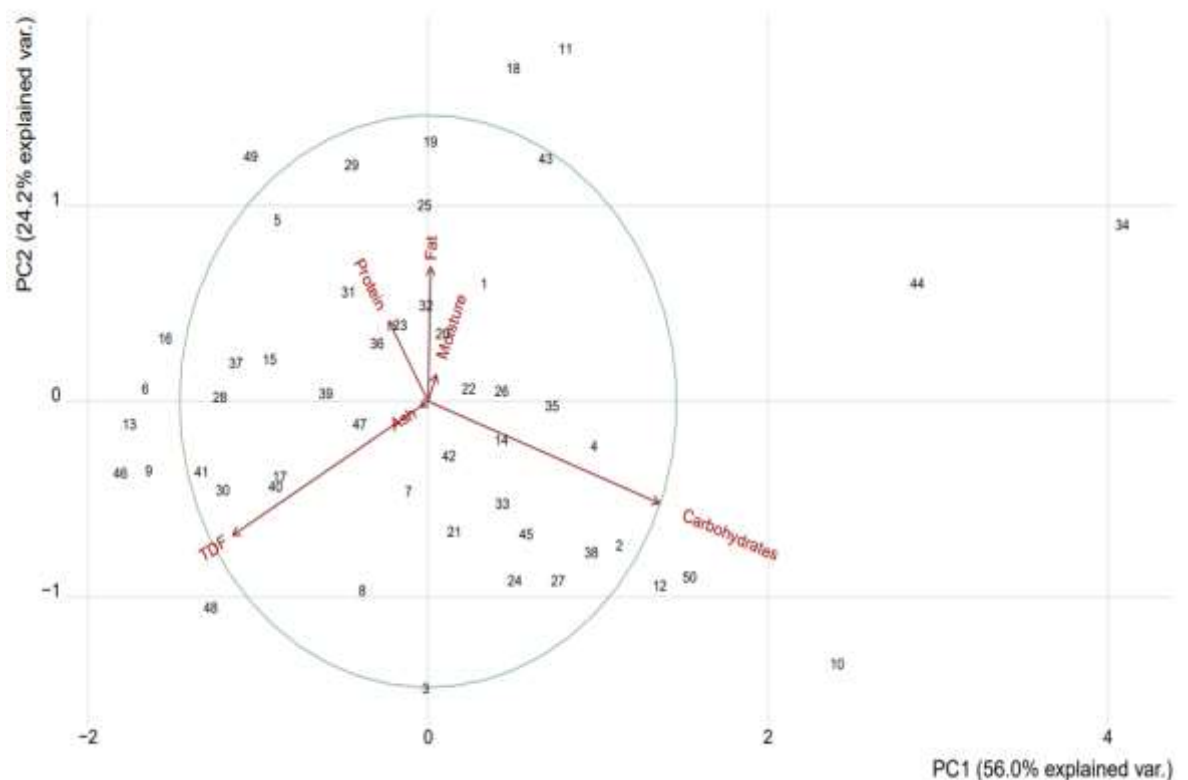
La Figura 4 indica el gráfico formado por el plano 1-2 (GGE Biplot). La Figura 4a presenta la inercia acumulada del 80,2 %, mientras que la Figura 4b muestra la inercia acumulada del 70,1 %. Los clústers se formaron utilizando seis variables y se calcularon utilizando las coordenadas del GGE Biplot.

La Figura 4a muestra la presencia de 27 muestras de harina de la Mezcla 1 que muestran los valores nutricionales más altos como humedad, proteína, grasa, ceniza y fibra dietética total ("FDT"); también muestra diferencias significativas en 10 muestras de harina que solo presentaron los valores más altos de carbohidratos y 13 muestras de harina que no presentaron valores nutricionales significativos. Además, la Figura 4b también presenta la presencia de 15 muestras de harina de la Mezcla 2 y los valores nutricionales más altos como humedad, proteína, grasa, ceniza y fibra dietética total

("FDT"), 17 muestras de harina solo mostraron los valores más altos de carbohidratos y 18 muestras de harina presentaron los parámetros nutricionales más bajos.

La proteína es uno de los nutrientes más importantes para la ingesta diaria, la grasa tiene una gran influencia en las propiedades organolépticas del producto, como el color, el aroma y el sabor; y la fibra dietética promueve la digestibilidad de los alimentos, lo que ayuda a reducir el riesgo de enfermedades, como el colesterol y la diabetes (Redgwell, et al., 2003; Whitney y Rolfes, 2008; Eswaran, 2013). Los valores de FDT y proteína indican la importancia de las mezclas para ser utilizadas como ingredientes en la elaboración de subproductos. Los valores de los parámetros nutricionales nos permiten indicar que las dos mezclas pueden ser un sustituto de la carne.

(a)



(b)

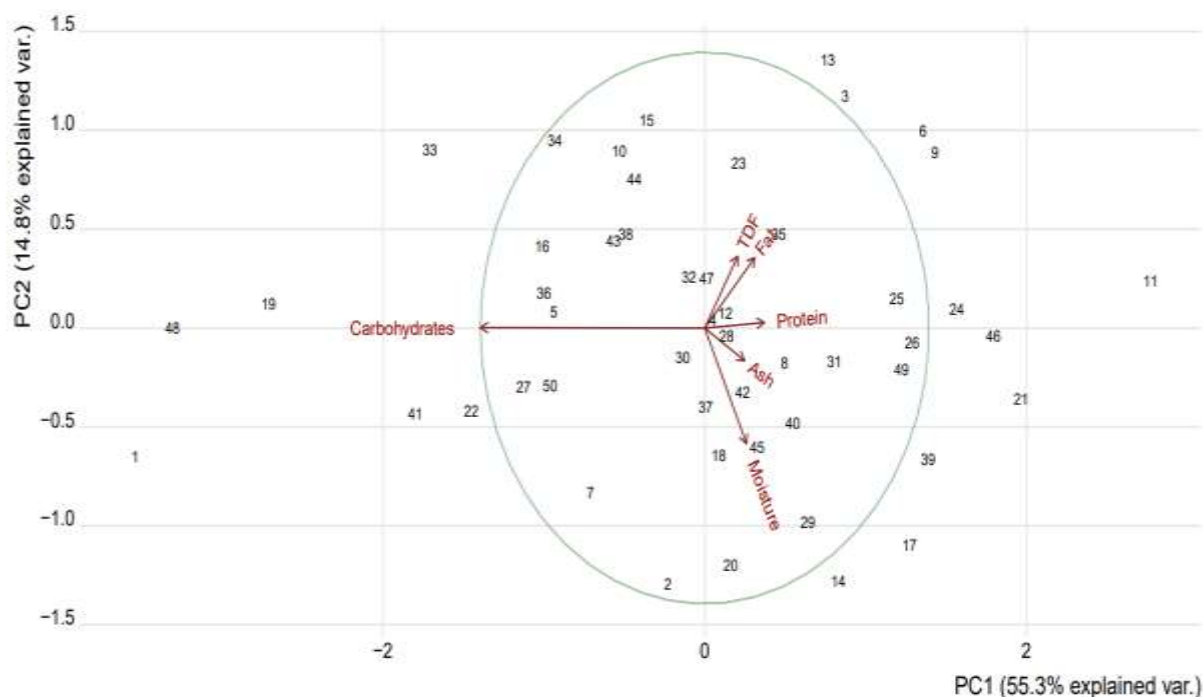


Figura 4. (a) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a valores nutricionales; (b) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a los valores nutricionales.

3.2.2. Técnicas Estadísticas Multivariantes para propiedades comerciales de mezclas de harinas

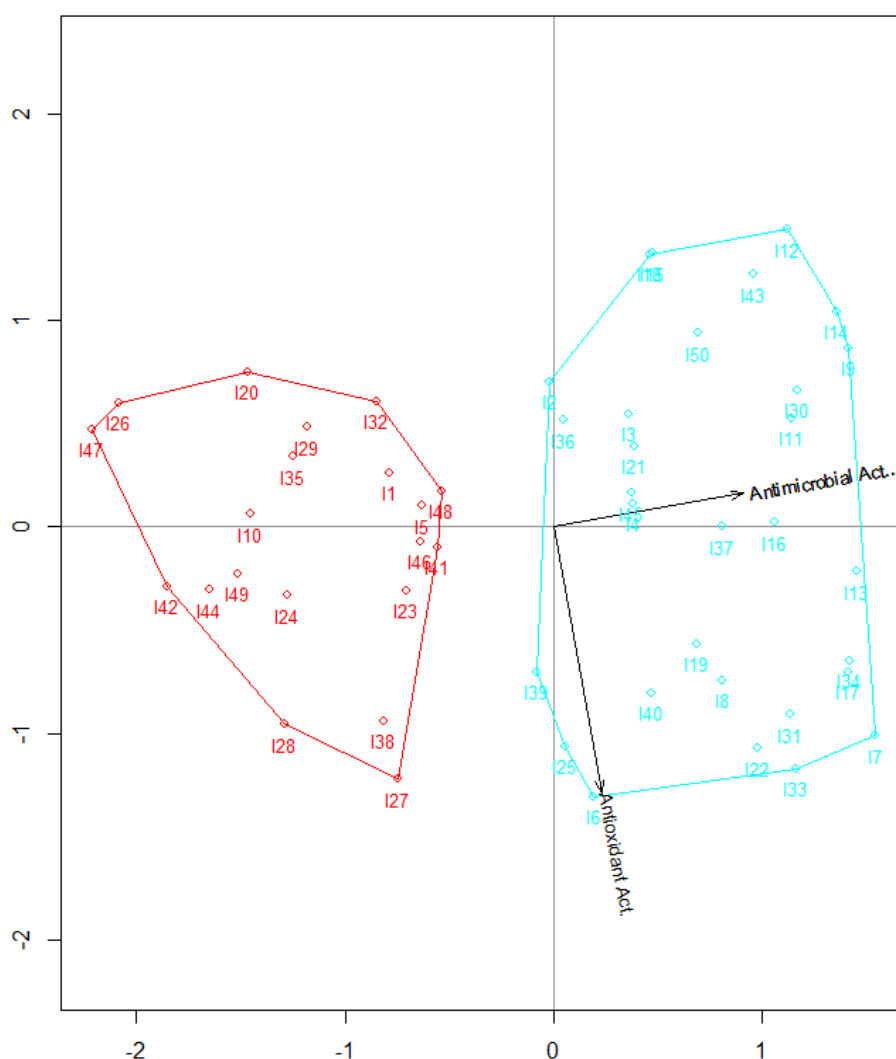
Las actividades biológicas indican la eliminación de microorganismos patógenos. La Figura 5 muestra la aplicación del algoritmo PCA Biplot a 50 objetos con dos variables (actividades antioxidante y antimicrobiana) utilizando el software RStudio. La Figura 5 presenta el gráfico factorial del plano 1-2 (PCA Biplot); La Figura 5a indica que la inercia acumulada asciende al 100 %, mientras que la Figura 5b indica que la inercia acumulada asciende al 100 %.

La Figura 5a presentó dos clústers correspondientes a las propiedades comerciales de las muestras de harina de la Mezcla 1, mientras que la Figura 5b mostró dos clústers correspondientes a las propiedades comerciales de las muestras de harina de la Mezcla 2. En la Figura 5a: el clúster 1 (puntos rojos) fue de 21 muestras, y el clúster 2 (puntos

azules) fue de 29 muestras. Las muestras pertenecientes al clúster 2 presentaron los valores más altos de actividad antioxidante y antimicrobiana. Para la Figura 5b: el clúster 1 (puntos azules) fue de 19 muestras y el clúster 2 (puntos rojos) fue de 31 muestras. Las muestras pertenecientes al clúster 2 destacaron los valores más altos de actividades antioxidante y antimicrobiana. Las muestras de harina de la Mezcla 1 indicaron las características comerciales más significativas en comparación con las muestras de harina de la Mezcla 2.

(a)

PCA Biplot (Dim 1 (67.8 %)- 2 (32.2 %))



(b)

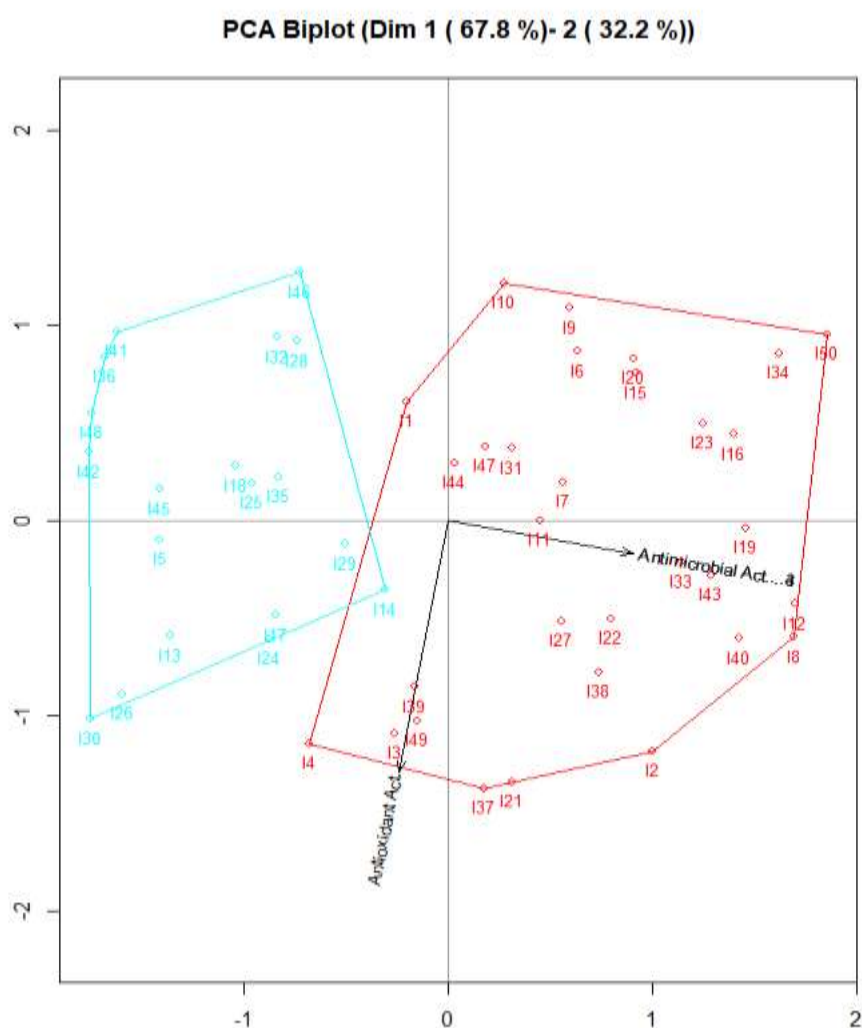


Figura 5. (a) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a propiedades comerciales; (b) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a propiedades comerciales.

La Figura 6 indica el plano 1-2 (GGE Biplot). La Figura 6a presenta la cantidad de inercia acumulada del 100 %, y la Figura 6b muestra la cantidad de inercia acumulada del 100 %. Los clústers se formaron usando dos variables y se calcularon usando coordenadas GGE Biplot.

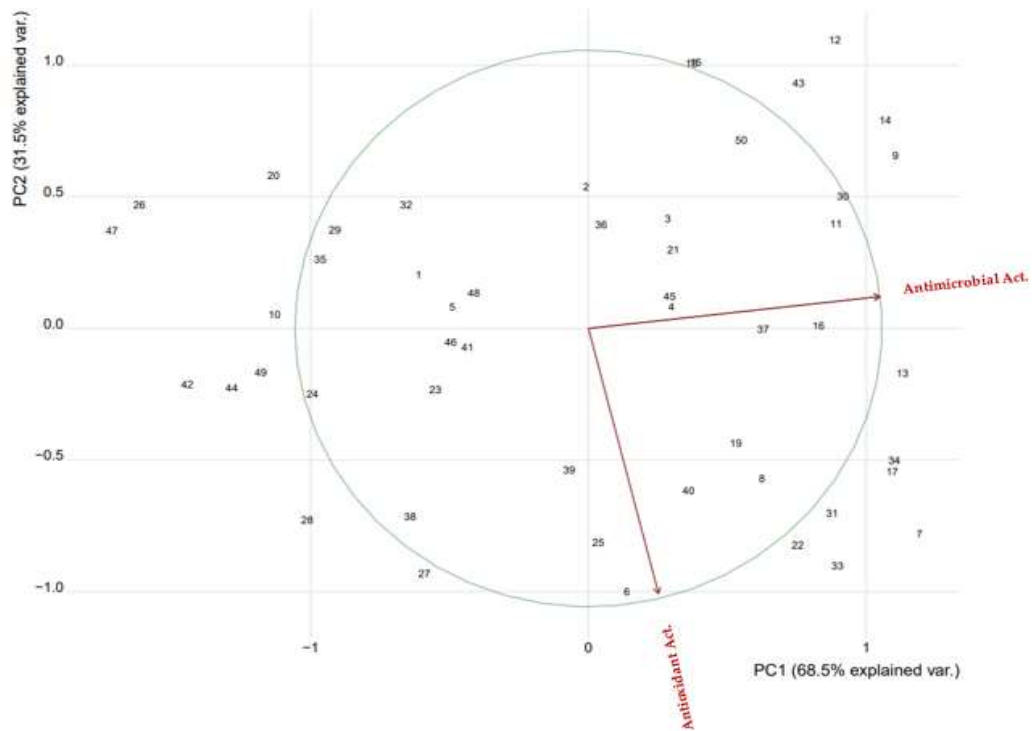
La Figura 6a indica 15 muestras de harina de la Mezcla 1 con los valores de propiedades comerciales más altos, como actividades antioxidantes y antimicrobianas, y muestra una diferencia significativa en 35 muestras de harina que no presentaron diferencias significativas en las actividades antioxidantes y antimicrobianas. La Figura 6b presenta 13 muestras de harina de la Mezcla 2 con los valores más altos de propiedades comerciales como actividades antioxidantes y antimicrobianas, y muestra una diferencia

importante con 37 muestras de harina que presentaron las actividades antioxidantes y antimicrobianas más bajas.

El potencial DPPH es un predictor significativo del valor de la actividad antioxidante de un producto alimenticio (Vargas-Arana et al., 2022). La cáscara de cacao y la soya son fuentes importantes de compuestos fenólicos, y también presentan altos valores de actividad antioxidante (De Barros et al., 2020). Las partículas más finas de los productos se relacionan con los valores más altos de actividad antioxidante debido a que tienen una mayor liberación de compuestos bioactivos (Botella-Martínez et al., 2021). El cacao “Arriba Nacional”, cultivado en la región amazónica de Ecuador presenta valores más altos de antocianinas y estilbenos (trans-resveratrol) en comparación con el cacao obtenido de la región costera (Mihai et al., 2022). Los residuos de cacao (cáscaras de cacao) se utilizan como ingrediente en la elaboración de bioproductos alimentarios por su alto contenido en polifenoles y fibra, o como agente antimicrobiano (Barišić et al., 2020). Las propiedades inhibitoras están influenciadas por las cepas de bacterias, la forma en que se obtuvo el extracto y si la materia prima se sometió o no a un tratamiento térmico (Marc et al., 2021). El consumo de productos o subproductos del cacao proporciona importantes beneficios para la salud (Perez et al., 2021).

PCA Biplot transforma variables correlacionadas en variables no correlacionadas denominadas componentes principales para reducir el número de variables y mostrar independencia. Por otro lado, el logaritmo GGE Biplot se utiliza en el campo de la agricultura para identificar las características del medio ambiente (Yan et al., 2000; Torres-Salinas et al., 2013). El uso de técnicas estadísticas multivariantes, como PCA Biplot y GGE Biplot, permiten describir una visualización real de las muestras de harina, correspondientes a la Mezcla 1 y la Mezcla 2, con los parámetros comerciales más altos. Los valores de actividades antioxidante y antimicrobiana son un buen indicador de la posibilidad de utilizar las mezclas en estudios in vivo.

(a)



(b)

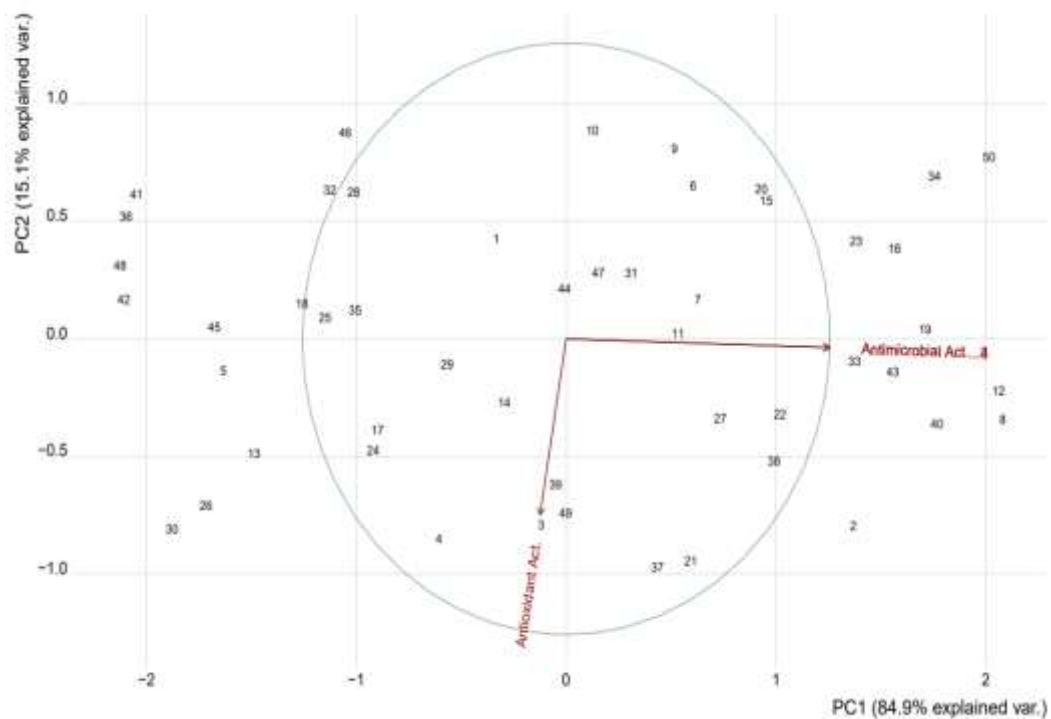


Figura 6. (a) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a propiedades comerciales; (b) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a propiedades comerciales.

Características de la Revista en que se publicó el artículo




Nombre de Revista: Sustainability

Factor de Impacto: 3.251

Cuartil: Q1

Article

Food Sustainability Study in Ecuador: Using PCA Biplot and GGE Biplot

Juan Diego Valenzuela-Cobos ¹, Fabricio Guevara-Viejó ¹, Purificación Vicente-Galindo ^{1,2,3}
and Purificación Galindo-Villardón ^{1,2,4,*}

¹ Centro de Gestión de Estudios Estadísticos, Universidad Estatal de Milagro (UNEMI), Milagro 091050, Ecuador

² Department of Statistics, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

³ Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), 37007 Salamanca, Spain

⁴ Centro de Investigación Institucional, Universidad Bernardo O'Higgins, Av. Viel 1497, Santiago 8370993, Chile

* Correspondence: pgalindo@usal.es; Tel.: +34-664038513

Abstract: Agriculture is one of the main sectors of Ecuador's economy, and the principal agricultural product for exportation is cocoa. Flour samples of two mixtures were taken: a total of 50 samples of 85% cocoa bean shell (harvested from a farm) mixed with 15% soy flour (Mixture 1) and 50 samples of 75% cocoa bean shell (harvested from a farm) mixed with 25% soy flour (Mixture 2). The parameters evaluated were: moisture, protein, fat, carbohydrates, ash, total dietary fiber (TDF), and biological activity. Multivariate statistical techniques, such as PCA biplots and GGE biplots, were used to present each parameter (vector) measured. The biplot techniques suggested that the flour samples corresponding to Mixture 1 indicated the most significant values of nutritional and commercial properties. The results suggest that the use of mixtures of cocoa bean shell flour with soy flour can be used as ingredients to produce new foods.

Keywords: new foods; nutritional and commercial parameters; GGE biplot; PCA biplot



Citation: Valenzuela-Cobos, J.D.; Guevara-Viejó, F.; Vicente-Galindo, P.; Galindo-Villardón, P. Food Sustainability Study in Ecuador: Using PCA Biplot and GGE Biplot. *Sustainability* **2022**, *14*, 13033. <https://doi.org/10.3390/su142013033>

Academic Editors: Abdo Hassoun, Monica Trif, María Carpena Rodríguez and Begüm Önal

Received: 14 September 2022

Accepted: 6 October 2022

Published: 12 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent decades, people have modified ecosystems more rapidly and extensively than in other periods of history, increasing the demands for food, fresh water, timber, fiber, and fuel [1]. Sustainability involves a high degree of cohesion and balance between the market, government, and civil society in designing participatory planning processes, which are understood as interactions between the agents involved in these processes, such as sustainable agriculture and water management. The five pillars of sustainability include productivity, stability and security, the protection of natural resources, viability, and acceptability. Important advances have been made in some aspects of environmental sustainability: the total area of protected areas has grown steadily in the last decade; the consumption of substances that deplete the ozone layer has decreased considerably; and the region has made progress in expanding the coverage of drinking water and sanitation services [2]. Agriculture is part of the second and twelfth sustainable development goals to achieve the eradication of hunger and meet the global demand for food in an environmentally sustainable way [3]. Studies have shown that the application of synthetic chemicals, such as pesticides, increase agricultural production while causing harmful effects on human health, the environment, biological diversity, and food production. The main challenge of food sustainability is to produce food for the consumption of people of different socioeconomic classes while protecting the environment and human health [4].

Agriculture is one of the most important activities of the Ecuadorian economy; it maintains an economic dynamic that supplies raw materials to the industry and guarantees the food security and sovereignty of the country [5]. The principal Ecuadorian agricultural products for exporting are: bananas, shrimp, and cocoa, with Ecuador being the main leader

in the production of the fine aroma cocoa called Cacao Arriba, which is internationally recognized [6]. Ecuador is the main country in the export and commercialization of the Arriba Nacional variety worldwide; this cocoa is known for its intense aroma [7]. Cocoa in Ecuador is characterized by a floral profile, of blackcurrant and spices, due to the phytochemical composition, which is influenced by the botanical origin, the place of growth, the time of sun and rain, the nutrients in the soil, the maturation, and the harvest [8,9]. The climate and geology of different regions of the country are important for the growth of this cocoa [10]. In addition, cocoa waste (cocoa bean shell, “CBS”) has been mainly employed to elaborate different food products, such as biscuits, gluten-free bread, functional beverages, pork sausages, cookies, chocolate muffins, cooked beef, extra virgin olive oil, jam, dairy drinks, yogurt drinks, extruded snacks, and pound cake [11,12]. Agriculture has been an obvious target for applying multivariate statistical techniques for big data to achieve practical and effective solutions [13].

Multivariate statistical techniques allow the handling of big data in order to analyze information that cannot be studied using conventional statistical methods. Currently, large databases are analyzed using data mining [14]. Multivariate statistical methods identify similarities between large databases [15]. For studies in agriculture, techniques such as PCA biplot and GGE biplot have been designed; these divide the data into different groups depending on the similarities they present. The present study is based on identifying groups that are generated from databases that are very useful in different areas, such as science, technology, engineering, and mathematics [16]. Additionally, the efficient use of these techniques is related to a probabilistic and well-founded model [17]. Different authors have indicated that clustering methods are a derivation of heuristic techniques [18]. For this reason, it is important to compare these two multivariate statistical techniques to define the best algorithm for the agricultural sector.

The objective of this research was to use multivariate statistical techniques, such as PCA biplot and GGE biplot, to identify the use of mixtures of cocoa bean shell flour and soy flour as ingredients in the production of new by-products.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

Cocoa bean shells were manually harvested from 50 farms located in the Province of Guayas, and 5 bags of 10 kg of soybeans (VARGAS brand) were purchased at the Central de Abasto “Montebello” in Guayaquil, Ecuador. The cocoa bean shells and soybeans were exposed directly to sunlight until they were dried, then ground into powder in a knife mill for 30 s and passed through to a mesh of 417 μm [19].

The edaphoclimatic characteristics of the Province of Guayas are: maximum temperature of up to 35 °C, minimum temperature of 16 °C, relative humidity of 89%, and annual rainfall of 810.2 mm.

2.2. Elaboration of Mixtures

The mixtures were made using the following compositions:

- Mixture 1 (M1): 85% cocoa bean shell (flour) harvested from a farm, mixed with 15% soy flour;
- Mixture 2 (M2): 75% cocoa bean shell (flour) harvested from a farm, mixed with 25% soy flour.

The proportions of cocoa bean shells (75% and 85%) were used in this research because authors have found high organoleptic properties when the content of cocoa bean shells increased [20].

2.3. Nutritional Composition of Mixtures

The nutritional composition of the mixtures was analyzed using AOAC procedures, analyzing protein, fat, carbohydrates, ash, and total dietary fiber (TDF). The protein content ($\text{N} \times 6.25$) was estimated using the Kjeldahl method.

The fat content was determined using a Soxhlet technique; a flask with hexane was adapted to the cartridge holder (3 g) and condenser, and the extraction was realized for 4 h. Once the extraction was finished, the solvent was removed by evaporation in a rotary evaporator. The fat was cooled in a desiccator and weighed.

To determine the ash content, the sample (0.5 g) was weighed in a porcelain crucible. Subsequently, the sample was heated in a burner until completely calcined. Next, the crucible with the sample was placed in a muffle at a temperature of 600 °C for 30 min.

Carbohydrates (%C) were determined using Equation (1) [21]:

$$C(\%) = 100 - (\%moisture + \%protein + \%fat + \%ash\ contents) \quad (1)$$

Equation (1). Carbohydrates of mixtures.

2.4. Antioxidant Activity

The antioxidant activity values were obtained using a DPPH assay. Firstly, 30 µL of the extract and 270 µL of methanol (DPPH radicals) were mixed in a 96-well plate. The reaction was incubated in the dark for 30 min, and the absorption was measured at 515 nm [22]. The DPPH assay was calculated according to a percentage of DPPH discoloration using Equation (2):

$$RSA(\%) = \frac{ADPPH - AS}{ADPPH} \times 100 \quad (2)$$

Equation (2). DPPH Assay.

2.5. Antimicrobial Activity

The evaluation of this activity was realized using the bacteria *Staphylococcus aureus* (ABP 784).

Bacterial suspensions were adjusted with sterile saline to a concentration of 1.0×10^6 CFU/mL. The extracts of the mixtures were dissolved in 30% ethanol and mixed with nutrient media for bacteria with 1.0×10^5 CFU per well of Tryptic Soy Broth in a final volume of 100 µL [23].

2.6. Multivariate Statistical Analysis

Multivariate statistical techniques, such as PCA biplots and GGE biplots, were realized using R, software version 4.1.1. (R Core Team, Vienna, Austria).

PCA Biplot

Substituting $Z = D_o V_{[r]}$ gives [24–26]:

$$\hat{D}_{o[r]} = ZV_{[r]}^T$$

$$ZV_{[r]}^T = D_o V_{[r]} V_{[r]}^T = D_o V_{[r]} \left(V_{[r]}^T V_{[r]} \right)^{-1} V_{[r]}^T$$

The representation of the sample projected on the biplot plane is given by:

$$d_{o\text{proj}}^T = d_o^T V_{[r]} \left(V_{[r]}^T V_{[r]} \right)^{-1} V_{[r]}^T = z^T V_{[r]}^T$$

The coordinates make projections on the biplot plane, which are given by z^T . That is, the sample is interpolated in the biplot plane by:

$$z^T = d_o^T V_{[r]}$$

GGE Biplot

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + l_k + (k) + t_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} refers to the observation obtained in the i -th genotype, evaluated at the j -th repetition, at the k -th location [27];

μ is the mean general;

t_i refers to the fixed effect of the i -th genotype used in the trials, with $i = 1, 2, \dots, \text{twenty}$;

l_k is the random effect of the k -th locality, with $k = 1, 2, \dots, 7$;

(k) is the effect random of the j -th repetition within the k -th locality, with $j = 1, 2, 3$;

t_{ik} is the random effect of the interaction between the i -th genotype with the k -th locality;

ϵ_{ijk} is the error associated with the observation Y_{ijk} .

3. Results and Discussion

The main objective of the study was to present the use of two mixtures of cocoa bean shell with soy flour for the production of new foods by analyzing different nutritional and commercial properties, such as moisture, protein, fat, carbohydrate, ash, total dietary fiber (TDF), and biological activity.

The samples of the cocoa bean shell and soy flour mixtures were made using the following distribution:

1–50: Flour samples corresponding to Mixture 1 (85% cocoa bean shell harvested from a farm, mixed with 15% soy flour);

51–100: Flour samples corresponding to Mixture 2 (75% cocoa bean shell harvested from a farm, mixed with 25% soy flour).

3.1. Multivariate Statistical Techniques for Nutritional Composition of Mixtures

The nutritional parameters of the mixtures of cocoa bean shells and soy flour allow us to show the importance of the health benefits of by-products. Figure 1 presents the plane 1-2 (PCA biplot); Graphic (a) indicates the accumulated inertia amounts to 53.8%, whereas Graphic (b) shows the accumulated inertia amounts to 54%. These figures present 50 flour samples corresponding to Mixture 1 or Mixture 2, with six variables (moisture, protein, lipid, carbohydrate, ashes, and total dietary fiber “TDF”), each one using the software RStudio.

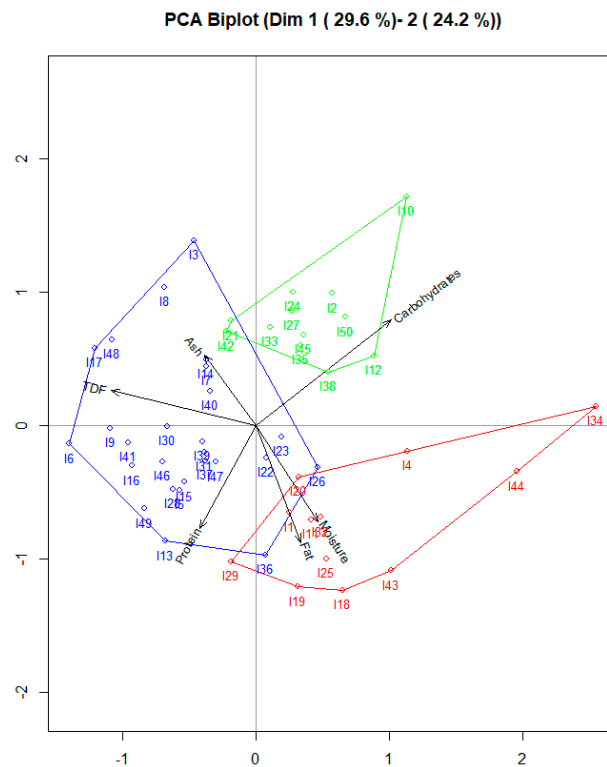
Figure 1a shows three groups corresponding to the nutritional values of the flour samples of Mixture 1, whereas in Figure 1b, the three groups presented correspond to the nutritional parameters of the flour samples of Mixture 2. The group method allows the identification and location of similar samples in the data reported in small areal units. Statistical distribution using groups indicates the statistical significance between the individuals. [28].

The size of each group is related to the number of data points. For Figure 1a: group 1 (blue points) was 27 samples, group 2 (green points) was 12 samples, and group 3 (red points) was 11 samples. The samples belonging to Mixture 1 (group 1) presented the highest values of nutritional parameters. Furthermore, for Figure 1b: group 1 (blue points) was 14 samples, group 2 (green points) was 19 samples, and group 3 (red points) was 17 samples. The samples belonging to Mixture 2 (group 1) presented the highest nutritional values. The data points present normal distribution, and the groups vary in size with the number of data points. Flour samples corresponding to Mixture 1 presented the highest nutritional parameters in comparison with the flour samples corresponding to Mixture 2.

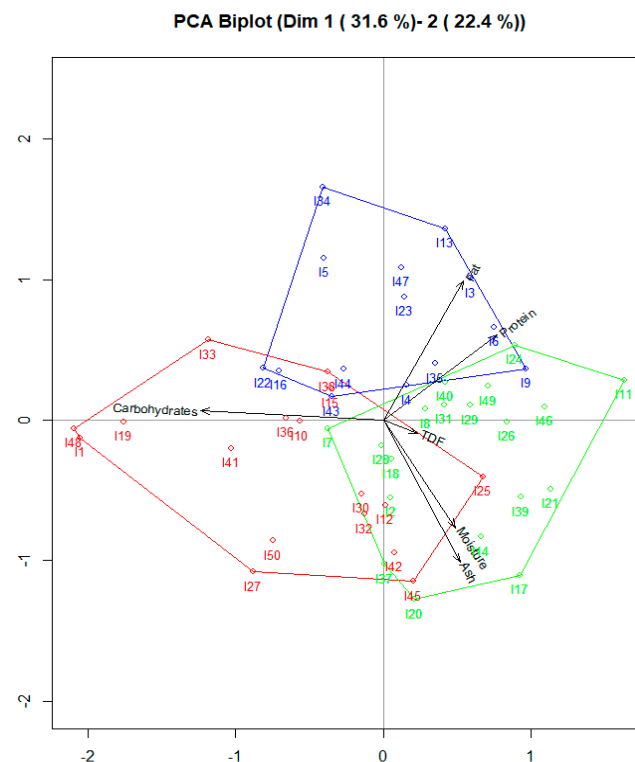
Figure 2 indicates the graph formed by the plane 1-2 (GGE biplot); Figure 2a presents the accumulated inertia amounts to 80.2%, whereas Figure 2b displays the accumulated inertia amounts to 70.1%. The groups were formed using six variables and were calculated using the GGE biplot coordinates.

Figure 2a shows the presence of 27 flour samples from Mixture 1 and the highest nutritional values, such as moisture, protein, fat, ash, and total dietary fiber (“TDF”); it also shows significant differences in 10 flour samples which only showed the highest carbohydrate values and 13 flour samples that did not present significant nutritional values. Moreover, Figure 2b also presents the presence of 15 flour samples of Mixture 2 and the highest nutritional values, such as moisture, protein, fat, ash, and total dietary fiber

(“TDF”); 17 flour samples only showed the highest carbohydrates values, and 18 flour samples presented the lowest nutritional parameters.

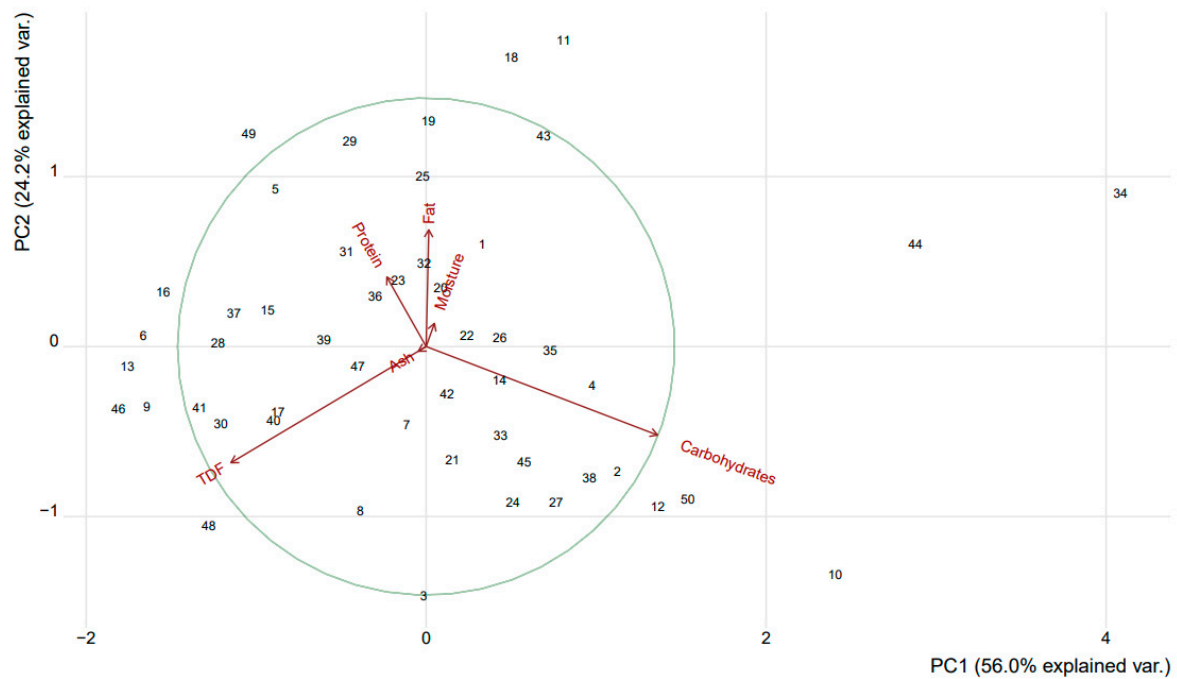


(a)

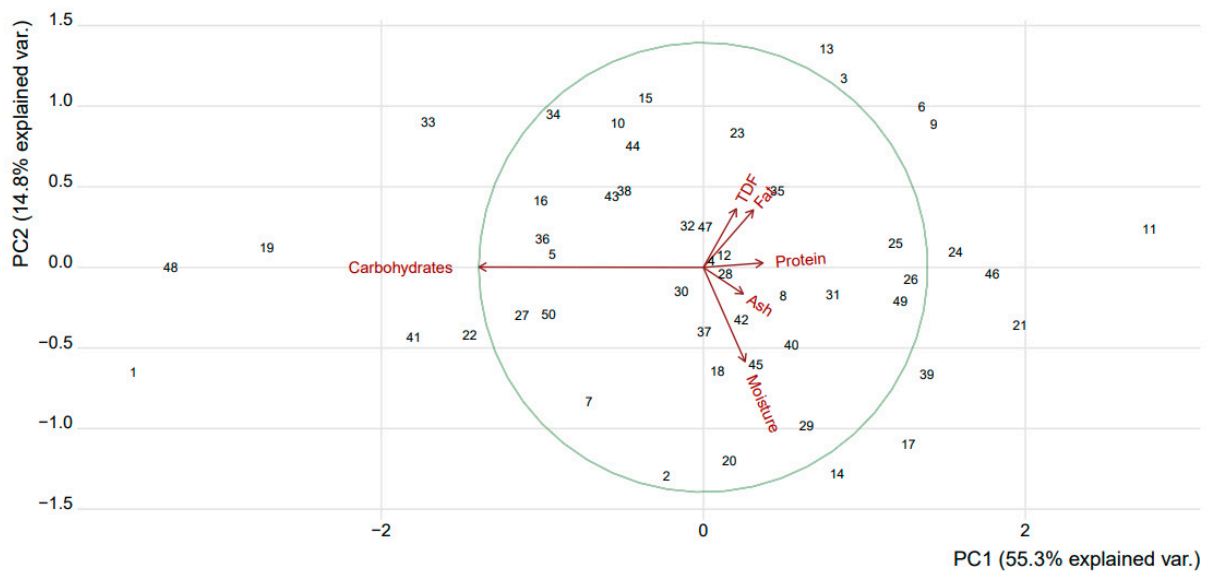


(b)

Figure 1. (a) PCA biplot of flour samples of Mixture 1 corresponding to nutritional values; (b) PCA biplot to flour samples of Mixture 2 corresponding to nutritional values.



(a)



(b)

Figure 2. (a) GGE biplot of flour samples of Mixture 1 corresponding to nutritional values; (b) GGE biplot of flour samples of Mixture 2 corresponding to nutritional values.

Protein is one of the most important nutrients for daily intake; fat has a great influence on the organoleptic properties of the product, such as the color, aroma, and flavor; and dietary fiber promotes the digestibility of food, helping to reduce the risk of diseases, such as cholesterol and diabetes [29–31]. The values of TDF and protein indicate the importance

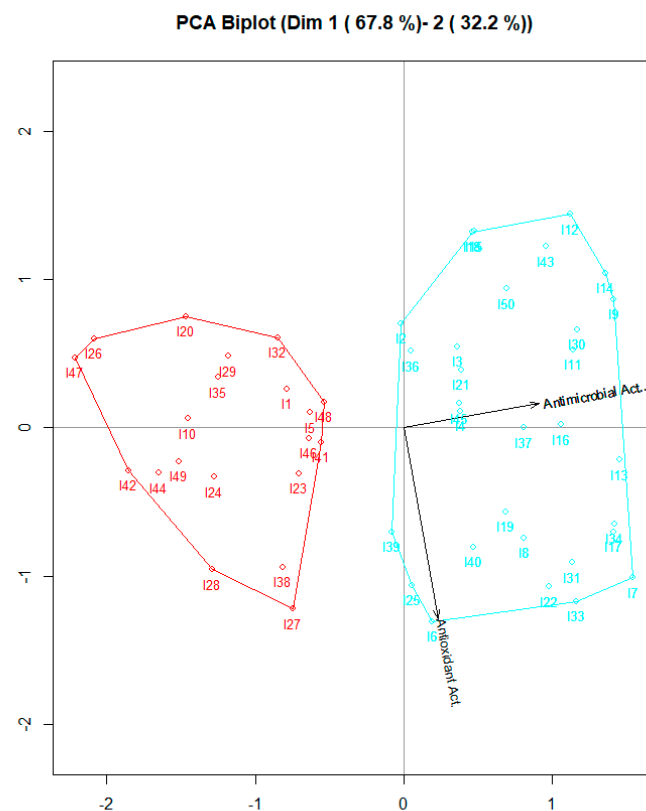
of the mixtures to be used as ingredients in the elaboration of by-products. The values of the nutritional parameters allow us to indicate that the two mixtures can be a substitute for meat.

3.2. Multivariate Statistical Techniques for Commercial Properties of Mixtures

The biological activities indicate the elimination of pathogenic microorganisms. Figure 3 shows the application of the PCA-biplot algorithm to 50 objects with two variables (antioxidant and antimicrobial activities), each one using the software RStudio. Figure 3 presents the factorial graph of the plane 1-2 (PCA biplot); Figure 3a indicates the accumulated inertia amounts to 100%, whereas Figure 3b points out the accumulated inertia amounts to 100%.

Figure 3a presented two groups corresponding to the commercial properties of flour samples of Mixture 1, whereas Figure 3b showed two groups corresponding to the commercial properties of flour samples of Mixture 2. In Figure 3a: group 1 (red points) was 21 samples, and group 2 (blue points) was 29 samples. Samples belonging to group 2 presented the highest values of antioxidant and antimicrobial activities. For Figure 3b: group 1 (blue points) was 19 samples, and group 2 (red points) was 31 samples. Samples belonging to group 2 highlighted the highest values of antioxidant and antimicrobial activities. Flour samples from Mixture 1 indicated the most significant commercial features in comparison with the flour samples from Mixture 2.

Figure 4 indicates the plane 1-2 (GGE biplot); Figure 4a presents the accumulated inertia amounts to 100%, and Figure 4b depicts the accumulated inertia amounts to 100%. Groups were formed using two variables, and they were calculated using GGE-biplot coordinates.



(a)

Figure 3. Cont.

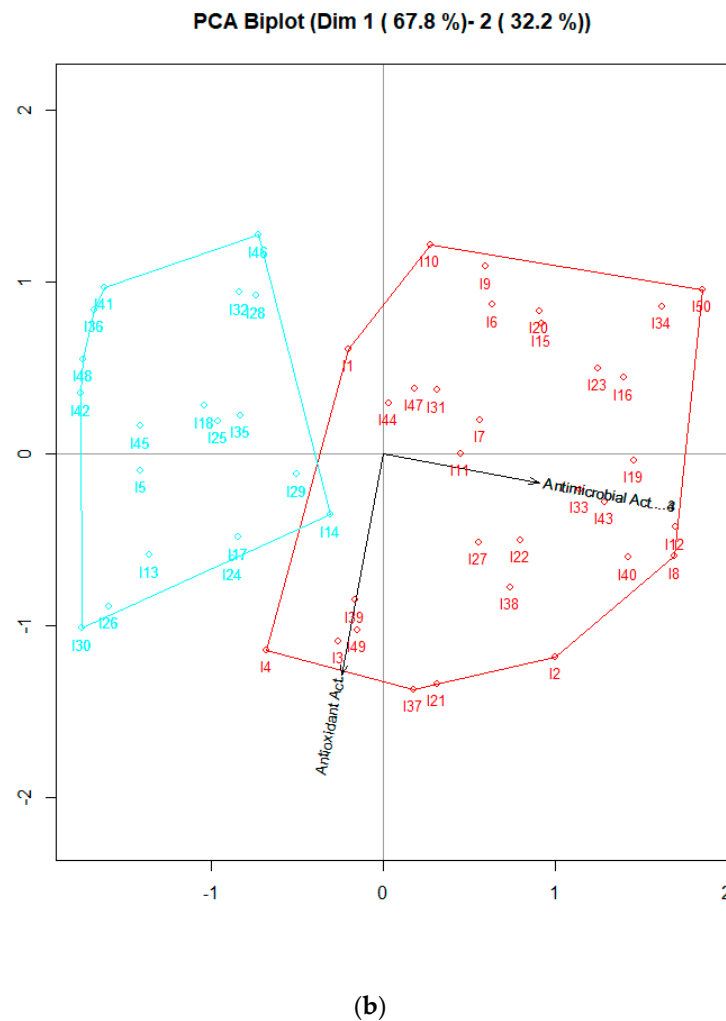
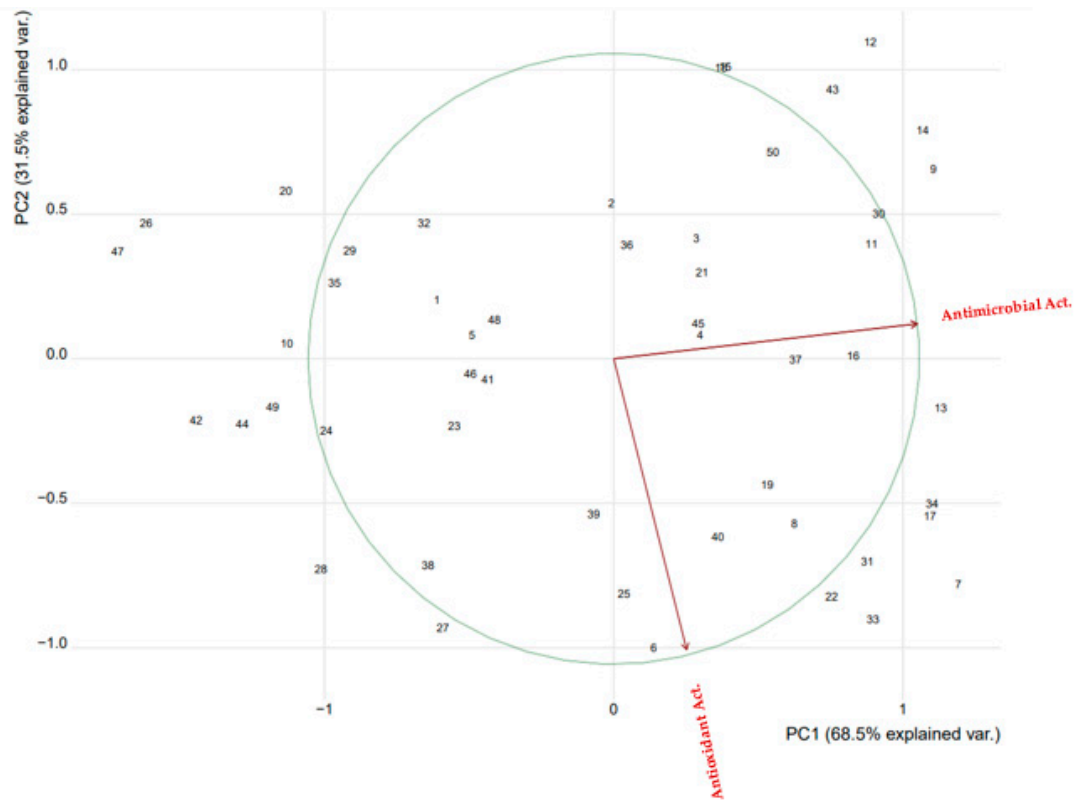


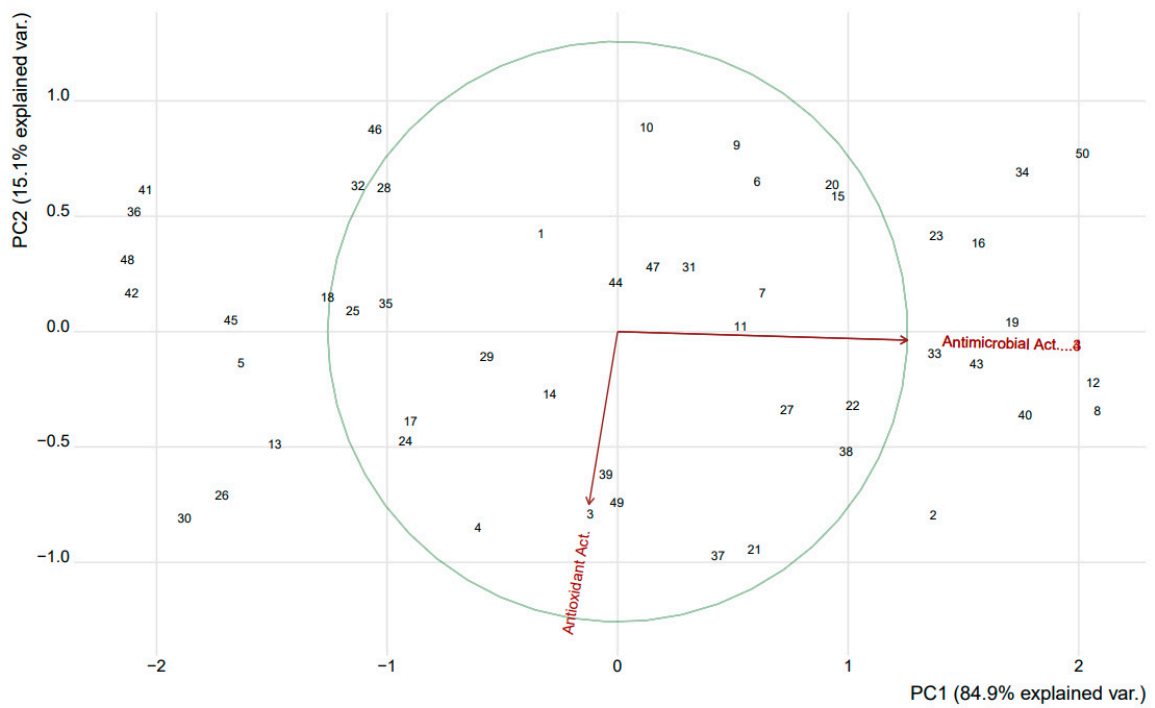
Figure 3. (a) PCA biplot of flour samples of Mixture 1 corresponding to commercial properties; (b) PCA biplot of flour samples of Mixture 2 corresponding to commercial properties.

Figure 4a indicates 15 flour samples from Mixture 1 with the highest commercial properties values, such as antioxidant and antimicrobial activities, and shows a significant difference in 35 flour samples that did not present significant antioxidant and antimicrobial activities. Figure 4b presents 13 flour samples from Mixture 2 with the highest commercial properties values, such as antioxidant and antimicrobial activities, and shows an important difference with 37 flour samples that present the lowest antioxidant and antimicrobial activities.

The DPPH potential is a significant predictor of the antioxidant activity value of a food product [32]. Cocoa shells and soybeans have been shown to be important sources of phenolic compounds, and they also have presented high values of antioxidant activity [33]. The finer particles of the products are related to the highest values of antioxidant activity because they have a greater release of bioactive compounds. [19]. Cocoa “Arriba Nacional”, cultivated in the Amazonian region of Ecuador, showed higher values of flavonoids, anthocyanins, and stilbenes (trans-resveratrol) compared to cocoa obtained from the coastal region [34]. Cocoa waste (cocoa shells) is used as an ingredient in the production of food bioproducts due to its high content of polyphenols and fiber, or it is used as an antimicrobial agent. [35]. The inhibitory properties are influenced by the bacteria strains, the manner in which the extract was obtained, and whether or not the raw material was subjected to heat treatment [36]. The consumption of cocoa products or by-products provides important health benefits [37].



(a)



(b)

Figure 4. (a) GGE biplot of flour samples of Mixture 1, corresponding to commercial properties; (b) GGE biplot of flour samples of Mixture 2, corresponding to commercial properties.

PCA biplot transforms correlated variables into uncorrelated variables called principal components in order to reduce the number of variables and show independence. On the other hand, the GGE-biplot logarithm is used in the field of agriculture to identify the characteristics of the environment [27,38]. The use of multivariate statistical techniques, such as PCA biplot and GGE biplot, described a real visualization of the flour samples, corresponding to Mixture 1 and Mixture 2, with the highest commercial parameters. The antioxidant and antimicrobial activity values are a good indicator of the possibility of using the mixtures in vivo studies.

4. Conclusions

The mixtures of cocoa bean shell flour and soy flour can be used as ingredients to produce new foods with higher nutritional values and commercial parameters.

Biplot techniques presented specific flour samples corresponding to Mixture 1, which showed the highest nutritional values, such as moisture, protein, fat, carbohydrate, ash, and TDF, and the commercial parameters, such as antioxidant and antimicrobial activities.

Multivariate statistical techniques can be used to describe improved combinations of ingredients (mixtures of flour), improving the production of new foods with important health benefits.

This research has shown the valorization of mixtures of cocoa shell flour and soybean flour as a biofunctional by-product, which can be a substitute for meat.

Author Contributions: Conceptualization, F.G.-V. and J.D.V.-C.; formal analysis, J.D.V.-C.; investigation, F.G.-V.; methodology, F.G.-V. and J.D.V.-C.; supervision, P.G.-V. and P.V.-G.; writing—original draft, F.G.-V., J.D.V.-C., P.G.-V. and P.V.-G.; writing—review and editing, P.G.-V. and P.V.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is funded by Universidad Estatal de Milagro (UNEMI) Scholarship.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Estatal de Milagro (UNEMI) and Ecuahidrolizados Industry.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kirschenmann, F. Alternative agriculture in an energy- and resourcedepleting future. *Renew. Agric. Food Syst.* **2010**, *25*, 85–89. [[CrossRef](#)]
2. Smyth, A.; Dumanski, J. *An International Framework for Evaluating Sustainable Land Management*; World Soil Resources Report; FAO: Rome, Italy, 1993.
3. Caiado, R.G.G.; Filho, W.L.; Quelhas, O.L.G.; de Mattos Nascimento, D.L.; Ávila, L.V. A literature-based review on potentials and constraints in the implementation of the sustainable development goals. *J. Clean. Prod.* **2018**, *198*, 1276–1288. [[CrossRef](#)]
4. Sarwar, M. The killer chemicals as controller of agriculture insect pests: The conventional insecticides. *Int. J. Chem Biomol. Sci.* **2015**, *1*, 141–147.
5. Notarnicola, B.; Sala, S.; Anton, A.; McLaren, S.J.; Saouter, E.; Sonesson, U. The role of life cycle assessment in supporting sustainable agri-food systems: A review of the challenges. *J. Clean. Prod.* **2017**, *140*, 399–409. [[CrossRef](#)]
6. Guillermo, J.C.; Garcia-Cedeño, A.; Rivas-Lalaleo, D.; Huerta, M.; Clotet, R. IoT Architecture based on Wireless Sensor Network Applied to Agricultural Monitoring: A Case of Study of Cacao Crops in Ecuador. In Proceedings of the International Conference of Information and Communication Technologies for Adapting Agriculture to Climate Change II, Cali, Colombia, 21–23 November 2018.
7. Jensch, C.; Schmidt, A.; Strube, J. Versatile Green Processing for Recovery of Phenolic Compounds from Natural Product Extracts towards Bioeconomy and Cascade Utilization for Waste Valorization on the Example of Cocoa Bean Shell (CBS). *Sustainability* **2022**, *14*, 3126. [[CrossRef](#)]
8. Evans, S.J. *Chocolate Unwrapped: Taste & Enjoy the World's Finest Chocolate*, 1st ed.; Pavilion: Shoreham, UK, 2010; p. 240.
9. Kongor, J.E.; Hinneh, M.; de Walle, D.V.; Afoakwa, E.O.; Boeckx, P.; Dewettinck, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile: A review. *Food Res. Int.* **2016**, *82*, 44–52. [[CrossRef](#)]

10. Moreno-Miranda, C.; Jordán, J.; Moreno-Miranda, R.; Moreno, P.; Solis, J. Protected designation of origin and sustainability characterization: The case of PDO cocoa Arriba. *Agriculture* **2019**, *9*, 229. [\[CrossRef\]](#)
11. Rojo-Poveda, O.; Barbosa-Pereira, L.; Zeppa, G.; Stevigny, C. Cocoa Bean Shell-A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients* **2020**, *12*, 1123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Younes, A.; Li, M.; Karboune, S. Cocoa bean shells: A review into the chemical profile, the bioactivity and the biotransformation to enhance their potential applications in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
13. Reinoso, L. Incidencia de la Agricultura en el Crecimiento y Desarrollo Económico del Ecuador del 2006 al 2012. Master's Thesis, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador, 2013.
14. Majumdar, J.; Naraseeyappa, S.; Ankalaki, S. Analysis of agriculture data using data mining techniques: Application of big data. *J. Big Data* **2017**, *4*, 20. [\[CrossRef\]](#)
15. Rodríguez, J.P.F.; Pérez, A.G. Aplicación de la minería de datos en la bioinformática. *ACIMED* **2002**, *10*, 69–76.
16. Suárez, Y.R.; Amador, A.D. Herramientas de minería de datos. *Rev. Cuba. Cienc. Inform.* **2011**, *3*, 3–4.
17. Guler, C.; Thyne, G.D.; McCray, J.E.; Turner, A.K. Evaluation of graphical and multivariate statistical methods for classification of water chemistry data. *Hydrogeol. J.* **2002**, *10*, 455–474. [\[CrossRef\]](#)
18. Flury, B. *A First Course in Multivariate Statistics*; Springer: New York, NY, USA, 1997.
19. Botella-Martínez, C.; Lucas-Gonzalez, R.; Ballester-Costa, C.; Pérez-Alvarez, J.A.; Fernández-López, J.; Delgado-Ospina, J.; Chaves-López, C.; Viuda-Martos, M. Ghanaian Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells Coproducts: Effect of Particle Size on Chemical Composition, Bioactive Compound Content and Antioxidant Activity. *Agronomy* **2021**, *11*, 401. [\[CrossRef\]](#)
20. Handojo, L.; Indarto, A. Cocoa bean skin waste as potential raw material for liquid smoke production. *Environ. Technol.* **2020**, *41*, 1044–1053. [\[CrossRef\]](#)
21. Guevara-Viejó, F.; Valenzuela-Cobos, J.D.; Vicente-Galindo, P.; Galindo-Villardón, P. Application of K-Means Clustering Algorithm to Commercial Parameters of *Pleurotus* spp. Cultivated on Representative Agricultural Wastes from Province of Guayas. *J. Fungi* **2021**, *7*, 537. [\[CrossRef\]](#)
22. Kostic, M.; Smiljkovic, M.; Petrovic, J.; Glamocilija, J.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R.; Ciric, A.; Sokovic, M. Chemical, nutritive composition and wide-broad bioactive properties of honey mushroom *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer. *Food Funct.* **2017**, *8*, 3239–3249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Tsukatani, T.; Suenaga, H.; Shiga, M.; Noguchi, K.; Ishiyama, M.; Ezoe, T.; Matsumoto, K. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *90*, 160–166. [\[CrossRef\]](#)
24. Gabriel, K.R. The biplot-graphical display of matrices with applications to principal component analysis. *Biometrika* **1971**, *58*, 453–467. [\[CrossRef\]](#)
25. Galindo, M.P. Una alternativa de representación simultánea: HJ-Biplot. *Questiío* **1986**, *10*, 13–23.
26. Gower, J.C.; Lubbe, S.; Le Roux, N.J. *Understanding Biplots*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2011.
27. Yan, W.; Hunt, L.A.; Sheng, Q.; Szlavnic, Z. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Sci.* **2000**, *40*, 597–605. [\[CrossRef\]](#)
28. Morphet, C.S. A statistical method for the identification of spatial clusters. *Environ. Plan A* **1997**, *29*, 1039–1055. [\[CrossRef\]](#)
29. Redgwell, R.; Trovato, V.; Merinat, S.; Curti, D.; Hediger, S.; Manez, A. Dietary fibre in cocoa shell: Characterisation of component polysaccharides. *Food Chem.* **2003**, *81*, 103–112. [\[CrossRef\]](#)
30. Whitney, E.; Rolfes, S. *Nutrição—Volume I: Entendendo os Nutrientes*, 1st ed.; Cengage Learning: Boston, MA, USA, 2008.
31. Eswaran, S.; Muir, J.; Chey, W.D. Fiber and functional gastrointestinal disorders. *Am. J. Gastroenterol.* **2013**, *108*, 718–727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Vargas-Arana, G.; Merino-Zegarra, C.; Tang, M.; Pertino, M.W.; Simirgiotis, M.J. UHPLC–MS Characterization, and Antioxidant and Nutritional Analysis of Cocoa Waste Flours from the Peruvian Amazon. *Antioxidants* **2022**, *11*, 595. [\[CrossRef\]](#)
33. De Barros, H.E.A.; Ntarelli, C.V.L.; Tavares, I.M.D.C.; De Oliveira, A.L.M.; Araújo, A.B.S.; Pereira, J.; Carvalho, E.E.N.; de Barros Vilas Boas, E.V.; Franco, M. Nutritional Clustering of Cookies Developed with Cocoa Shell, Soy, and Green Banana Flours Using Exploratory Methods. *Food Bioprocess Technol.* **2020**, *13*, 1566–1578. [\[CrossRef\]](#)
34. Mihai, R.A.; Abarca, P.A.L.; Romero, B.A.T.; Florescu, L.I.; Catană, R.; Kosakyan, A. Abiotic Factors from Different Ecuadorian Regions and Their Contribution to Antioxidant, Metabolomic and Organoleptic Quality of *Theobroma cacao* L. Beans, Variety “Arriba Nacional”. *Plants* **2022**, *11*, 976. [\[CrossRef\]](#)
35. Barišić, V.; Stokanović, M.C.; Flanjak, I.; Doko, K.; Jozinović, A.; Babić, J.; Šubarić, D.; Miličević, B.; Cindrić, I.; Ačkar, Đ. Cocoa Shell as a Step Forward to Functional Chocolates—Bioactive Components in Chocolates with Different Composition. *Molecules* **2020**, *25*, 5470. [\[CrossRef\]](#)
36. Marc, R.A.; Niculae, M.; Páll, E.; Muresan, V.; Muresan, A.; Tanislav, A.; Puscas, A.; Muresan, C.C.; Cerbu, C. Red Oak (*Quercus rubra* L.) Fruits as Potential Alternative for Cocoa Powder: Optimization of Roasting Conditions, Antioxidant, and Biological Properties. *Forests* **2021**, *12*, 1088. [\[CrossRef\]](#)
37. Perez, M.; Lopez-Yerena, A.; Vallverdú-Queralt, A. Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: A challenge for the chocolate industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *62*, 475–489. [\[CrossRef\]](#)
38. Torres-Salinas, D.; Robinson-García, N.; Jiménez-Contreras, E.; Herrera, F.; López-Cózar, E.D. On the use of biplot analysis for multivariate bibliometric and scientific indicators. *J. Am. Soc. Inf. Sci. Technol.* **2013**, *64*, 1468–1479. [\[CrossRef\]](#)

CAPÍTULO IV

BIOCONTROL ECOLÓGICO DE MONILIASIS EN CACAO ECUATORIANO: USANDO TÉCNICAS BILOT

CAPÍTULO IV

4. BIOCONTROL ECOLÓGICO DE MONILIASIS EN CACAO ECUATORIANO: USANDO TÉCNICAS BIPLLOT

4.1. Metodología

Los datos utilizados en este artículo científico se obtuvieron de forma experimental por el autor de esta tesis y con los técnicos de la Empresa Ecuahidrolizados S.A.S.

4.1.1. Cepas de hongos

Este estudio utilizó 50 cepas de *Trichoderma* spp., 1 cepa de *Moniliophthora roreri* y 1 cepa de *Moniliophthora perniciosa*. Las cepas se mantuvieron en placas de PDA y se depositaron en la colección de hongos del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Ecuahidrolizados.

4.1.2. Preparación de mezclas de medios de cultivo

El medio PDA se preparó combinando 39 g de agar papa dextrosa en 1 L de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, mientras que el medio EMA se preparó disolviendo 18 g de extracto de malta y 15 g de agar bacteriológico en 1 L de agua destilada usando un matraz.

En ambos casos, el matraz se esterilizó en autoclave a 15 psi (121 °C) durante 15 min. Posteriormente, se vertieron 10 mL del medio estéril en cajas de Petri. Las placas con medio solidificado se colocaron en bolsas de plástico y se incubaron a 28 °C durante 24 h para verificar la esterilidad. A continuación, se utilizaron las cajas Petri sin contaminación para la propagación del micelio de los hongos (Hernández et al., 2019; Valenzuela-Cobos et al., 2019a).

4.1.3. Crecimiento micelial

El crecimiento micelial de 50 *Trichoderma* spp. en platos PDA o placas MEA se determinó utilizando la ecuación de Gompertz modificada (Ecuación (3)) (Liu et al., 2017; Wawrzyniak, 2021).

$$\log N = A + C * \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (3)$$

Ecuación 3. Modelo de Gompertz modificado.

donde:

A, B, C= parámetros del modelo;

t = días;

M = día con máxima tasa de crecimiento;

log N = cinética de crecimiento.

Con base en la cinética de crecimiento, se calcularon el crecimiento máximo, μ_{\max} , (Ecuación 4)) y la fase de latencia λ (Ecuación 5)) (Valenzuela-Cobos et al., 2021; Wawrzyniak, 2021):

$$\mu_{\max} = (B * C)/e \quad (4)$$

Ecuación 4. Crecimiento máximo.

donde:

e = La constante de Euler.

$$\lambda = [\ln(1 + (\mu_{\max}/v))] / \mu_{\max} \quad (5)$$

Ecuación 5. Fase de latencia.

donde:

v = μ_{\max} .

4.1.4. Capacidad antagónica

Se colocaron discos de 5 mm de diámetro de *M. roreri* o *M. pernicioso* que tenían 7 días de crecimiento micelial en un extremo de las cajas de Petri que contenían PDA o EMA, a 1,5 cm del borde. De lo contrario, discos de 5 milímetros de diámetro de *Trichoderma* spp. con 4 días de crecimiento micelial se colocaron en el extremo opuesto de la caja de Petri, y los enfrentamientos se mantuvieron a 6 cm equidistantes entre sí. Los crecimientos lineales de las dos colonias enfrentadas se registraron dos veces al día hasta la colonización total de la placa de Petri.

El porcentaje de inhibición de patógenos (ATP) se determinó con base en el

crecimiento radial del micelio de los controles de patógenos con respecto a los enfrentamientos entre *Trichoderma* spp. y patógenos, usando la Ecuación 6 (Urbez-Torres et al., 2020):

$$ATP = 100 * [RPC - \frac{(RFP-RIP)}{RPC}] \quad (6)$$

Ecuación 6. Inhibición de patógenos.

donde:

RPC = radio de crecimiento del micelio del patógeno de control en el último día;

RFP = radio de crecimiento del micelio patógeno en presencia del antagonista en el último día;

RIP = radio de crecimiento del micelio del patógeno el día que se inició el enfrentamiento, aún sin el antagonista (cultivo al séptimo día).

4.1.5. Prueba Experimental

La experimentación se realizó en la finca “Esmeraldas” ubicada en la Provincia de Los Ríos, la cual cuenta con plantaciones de cacao de 15 años de antigüedad.

En la finca se establecieron 15 subparcelas. Cada subparcela estaba compuesta por 25 árboles en un cuadrado de 5 × 5. La biosolución se obtuvo mediante una dosis de 1 × 10⁹ conidios/mL⁻¹, y se rociaron 0,2 L de la biosolución por árbol de cacao a intervalos de 15 días durante 5 meses. El diseño experimental fue el siguiente:

Subparcelas 1, 2 y 3 = Tratamiento testigo sin biosolución;

Subparcelas 4, 5 y 6 = Tratamiento con biosolución utilizando la cepa *Trichoderma* 17 “T1”;

Subparcelas 7, 8 y 9 = Tratamiento con biosolución utilizando la cepa *Trichoderma* 33 “T2”;

Subparcelas 10, 11 y 12 = Tratamiento con biosolución utilizando la cepa *Trichoderma* 42 “T3”;

Subparcelas 13, 14 y 15 = Tratamiento con biosolución utilizando la cepa *Trichoderma* 44 “T4”.

La incidencia de mazorcas de cacao con síntomas de monialiasis se determinó mediante la Ecuación (7), mientras que la eficiencia del tratamiento se calculó mediante la Ecuación (8) (Leiva et al., 2020):

$$I = \frac{DP}{TP} \times 100 \quad (7)$$

Ecuación 7. Incidencia sobre las mazorcas de cacao.

donde:

I = Incidencia (%);

DP = Número de mazorcas dañadas;

TP = Mazorcas totales.

$$E = \frac{FIWoT - FIWT}{FIWoT} \times 100 \quad (8)$$

Ecuación 8. Eficiencia del tratamiento.

donde:

E = Eficiencia (%);

FIWoT = Porcentaje de incidencia final sin aplicación de *Trichoderma* spp.;

FIWT = Porcentaje de incidencia final con aplicación de *Trichoderma* spp.

El rendimiento se estimó en kg de cacao en grano seco, y el peso seco se calculó como el 40 % del peso fresco del cacao (Leiva et al., 2020).

4.1.6. Análisis Estadístico

Las características del micelio de velocidad máxima, fase de latencia y el porcentaje de capacidad antagónica de inhibición de patógenos se midieron por triplicado y los datos se sometieron a técnicas de minería de datos, como PCA Biplot y GGE Biplot, utilizando el software R ver. 4.1.1.

Los resultados de la prueba experimental se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar la significación de las diferencias individuales al nivel de $p < 0,05$, el rendimiento de las mazorcas de cacao y la eficiencia del tratamiento (con o sin solución). Luego de estas pruebas, si se encontraron diferencias estadísticas, se aplicó la prueba de Duncan con $\alpha = 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo utilizando software estadístico (Statgraphic ver. 16).

4.1.7. PCA Biplot

El análisis de componentes principales se utiliza en casos de variable continua. Su propósito es reducir el número de variables al representar la matriz de datos en una dimensionalidad menor que la original (Greenacre et al., 2022).

En este análisis se aproxima la matriz centrada y/o escalada de rango r a través de

su proyección ortogonal de rango inferior a través de q vectores lineales e independientes. Estas matrices representan las columnas de una matriz llamada T , tal que $T'T = 1$. La solución es encontrar T , que debe ser simétrica y definida positivamente, de modo que minimice el error cuadrático medio de las predicciones $\|X_c - \hat{X}_c\|$:

$$X_c \cong X_c T T' = Z T'$$

donde:

Z contiene los componentes principales.

Si T es igual a la ecuación anterior, sus columnas coinciden con los autovectores asociados a los q mayores autovalores de la matriz de varianzas-covarianzas.

Además, si se considera el DVS de la ecuación anterior, se encuentra que (Gabriel, 1971; Galindo, 1986).

$$X_c \cong (UDV')V V' = U D V' = U D V'$$

4.1.8. GGE Biplot

El procedimiento de construcción biplot consiste en encontrar la mejor matriz X^* de rango 2. El término GGE es la contracción de $G+GE$. Un biplot que representa el GGE de un conjunto de datos MET se denomina GGE Biplot. El modelo GGE Biplot se utilizó para el análisis de estabilidad fenotípica (Khan et al., 2021). Las ecuaciones anteriores se pueden escribir como (Burgueño et al., 2001):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \theta_{ij}$$

O como:

$$Y_{ijk} - \mu - \beta_j = \alpha_i + \theta_{ij}$$

donde:

Y_{ijk} = Rendimiento esperado del genotipo i en el ambiente j ;

μ = Media global de todas las observaciones;

α_i = Efecto principal del genotipo i ;

β_j = Efecto principal del ambiente j ;

θ_{ij} = Interacción entre el genotipo i y el ambiente j .

4.2. Resultados y discusiones

El enfoque de esta investigación fue identificar *Trichoderma* spp. cultivadas en dos medios (placas PDA o EMA) con las más altas características miceliales (máxima velocidad y fase de latencia), así como la capacidad antagónica frente a dos patógenos del cultivo del cacao: *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*. La incidencia de moniliasis y la eficacia del tratamiento con o sin biosolución a base de *Trichoderma* spp. fueron calculados.

La numeración de las cepas se realizó utilizando la siguiente distribución: 1–50: *Trichoderma* spp. cultivadas en placas de PDA o *Trichoderma* spp. crecimiento en placas EMA.

4.2.1. PCA Biplot para características miceliales y capacidad antagónica de *Trichoderma* spp.

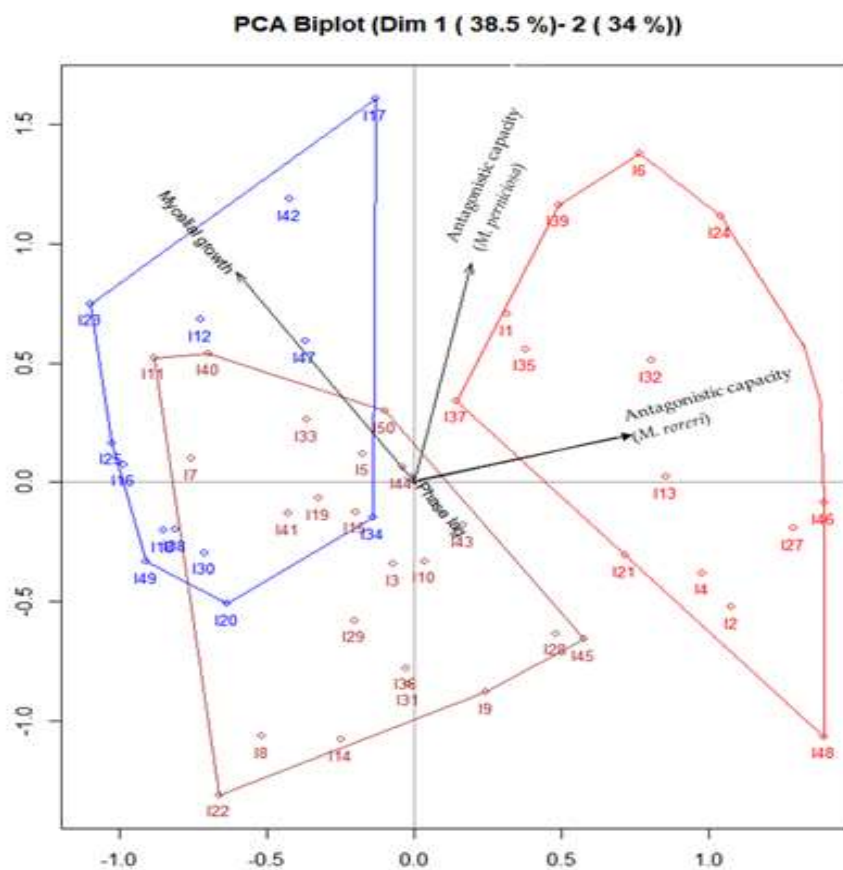
La Figura 7 presenta el gráfico factorial de los planos 1–2 (PCA Biplot). La Figura 7a muestra que la inercia acumulada ascendió al 72,5 %, mientras que la Figura 7b muestra que la inercia acumulada ascendió al 95,7 %. Adicionalmente, los clústers se determinaron mediante las coordenadas biplot en base a tres variables: el crecimiento micelial, la capacidad antagónica frente a *Moniliophthora roreri* y la capacidad antagónica frente a *Moniliophthora perniciosa*.

La Figura 7a muestra la presencia de 50 cepas de *Trichoderma* cultivadas en placas de PDA. El clúster 1 (color rojo) muestra la presencia de 14 *Trichoderma* spp. con la relación más fuerte con la capacidad antagónica contra *Moniliophthora roreri*. Los clústers 2 y 3 (colores azul y café, respectivamente) denotan la presencia de las 21 cepas de *Trichoderma* con el mayor crecimiento micelial. El clúster 3 (color café) indica la presencia de 15 cepas de *Trichoderma* con el mayor fase de latencia. Por otro lado, la Figura 7b muestra el crecimiento de 50 cepas de *Trichoderma* en placas con medio EMA. El clúster 1 (color rojo) indica la presencia de 20 cepas de *Trichoderma* con relación más fuerte con la capacidad antagónica frente a *Moniliophthora roreri*. El clúster 2 (color café) muestra la presencia de 10 cepas de *Trichoderma* con relación directa a la capacidad antagónica frente a *Moniliophthora perniciosa*. El clúster 3 (color azul) indica la presencia de 20 cepas de *Trichoderma* con la mayor velocidad micelial. Arzate-Vega et al., 2006 indicaron que el hongo antagónico presenta mayor agresividad hacia la resistencia del fitopatógeno si hay menos días de contacto.

Las actividades antagonicas de los hongos *Trichoderma* frente a *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* han sido estudiadas en diferentes trabajos de investigación; estas actividades incluyen la inhibición del crecimiento de estos patógenos y una reducción de los síntomas de la moniliasis. Los hongos *Trichoderma* presentaron un porcentaje de inhibición del 23% para *M. roreri* y del 27% para *Moniliophthora perniciosa* (Mejía et al., 2008), mientras que otros estudios demostraron que los agentes de biocontrol endófitos, como *Trichoderma* spp. son antagonistas de *Moniliophthora roreri* porque germinan y penetran la superficie del cultivo para establecer sus sistemas en la infección, demostrándose una reducción del 23,8% en la presencia de moniliasis en cultivos de cacao (Krauss et al., 2010). En otro estudio se aislaron siete microorganismos de la rizosfera de cacao y se estudió su capacidad de antagonismo frente al patógeno *Moniliophthora roreri*. *Trichoderma* spp. presentaron el mayor porcentaje de inhibición y esporulación de *Moniliophthora roreri* (Villamil Carvajal et al., 2012).

Trichoderma spp. utilizan varios mecanismos de control biológico que pueden estimular el crecimiento de las plantas e inducir respuestas de defensa (Ketta et al., 2021). *Trichoderma* spp. se utilizan principalmente para biorremediación en suelos con alto contenido de herbicidas o pesticidas, ayudando a reducir estos contenidos (Nayak et al., 2021). La aplicación de este género de hongos elimina las escobas producidas por *Moniliophthora perniciosa*, lo que evita la propagación de la enfermedad en oídos sanos y reduce la incidencia de infección (Sousa Filho et al., 2021). *Trichoderma* proporciona un buen control relativo a la no acción, reduciendo los efectos en la economía ecuatoriana de la infección con este cultivo.

(a)



(b)

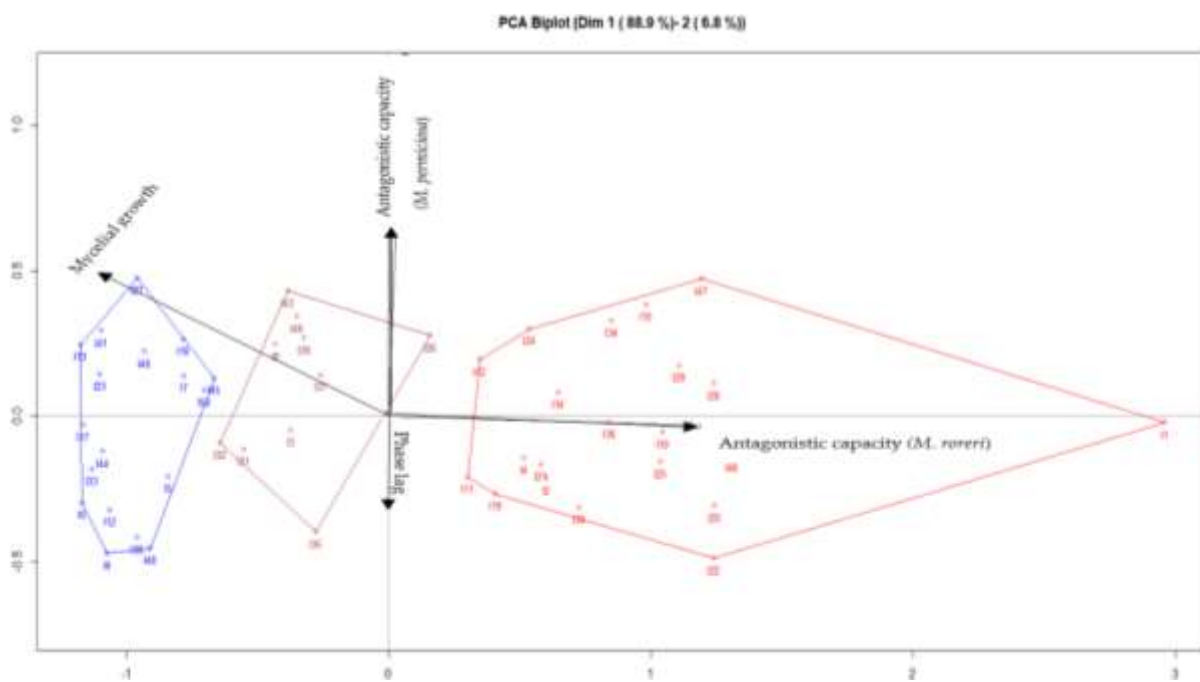


Figura 7. (a) PCA Biplot para características miceliales y capacidades antagonicas de *Trichoderma* spp. cultivadas en medio PDA., (b) PCA Biplot para características miceliales y capacidades antagonicas de *Trichoderma* spp. crecidas en medio EMA..

4.2.2. GGE Biplot para las características del micelio y la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp.

La Figura 8 presenta el gráfico factorial de los planos 1–2 (GGE Biplot). La Figura 8a muestra que la inercia acumulada ascendió al 72,5%, mientras que la Figura 8b indica que la inercia acumulada ascendió al 95,7%. El GGE Biplot muestra las cepas de *Trichoderma* (color verde) que presentaron los valores más altos de crecimiento micelial y capacidad antagónica.

La Figura 8a muestra las 50 cepas de *Trichoderma* cultivadas en las placas con PDA. Se observó que nueve de las cepas de *Trichoderma* presentaron una mayor relación con el crecimiento micelial, seis presentaron una mayor relación con la capacidad antagonista frente a *Moniliophthora perniciosa* y dos mostraron una mayor relación con la capacidad antagonista frente a *Moniliophthora roeri*. La Figura 8b indica el crecimiento de 50 *Trichoderma* spp. en las placas con EMA. Seis de estas cepas mostraron una mayor relación con el crecimiento micelial y con la capacidad antagónica frente a *Moniliophthora perniciosa*. En conclusión, el PCA Biplot y el GGE Biplot indicaron que las cepas 17, 33, 42 y 47 cultivadas en las placas con PDA presentaron mayores valores de crecimiento micelial y capacidad antagónica contra *Moniliophthora perniciosa* en comparación con *Trichoderma* spp. cultivadas en las placas con EMA. El medio más utilizado en la propagación de diferentes tipos de hongos es el PDA debido a su composición nutricional (Grey et al., 2021). Diferentes autores han indicado que las cepas de hongos cultivadas en este medio presentaron las características miceliales más fuertes (Ochoa-Velasco et al., 2018). Sin embargo, el uso del medio EMA en la propagación de *Trichoderma* spp. se estudió para obtener un bajo grado de esporulación. Las esporas de *Trichoderma* obtenidas en medios líquidos pierden su viabilidad debido a factores físicos, como el adelgazamiento de sus paredes celulares y el mayor número de orgánulos (Illescas et al., 2021). La mayor producción de esporas se obtiene en medios sólidos con presencia de una fuente de azúcares (Valenzuela Cobos et al., 2019b); por esta razón, es importante generar esporas en cultivos en medios sólidos.

La producción de esporas es estimulada por los siguientes factores: un medio de cultivo sólido con alto contenido de lignina, la temperatura de incubación, el contenido de humedad, el período de incubación y la concentración del inóculo. La lignina presente en el medio de cultivo genera una barrera físico-química frente al ataque microbiano. La temperatura óptima para la máxima producción de esporas de *Trichoderma* es de 25 °C. Las altas temperaturas afectan el crecimiento microbiano debido a alteraciones en la

estructura de la membrana y la degradación de proteínas, mientras que las bajas temperaturas afectan la producción de esporas (Mulatu et al., 2021). El contenido de humedad óptimo en el cultivo para la producción de esporas es del 65%. Un menor contenido de humedad en el medio de cultivo reduce la solubilidad de los nutrientes y aumenta la tensión superficial del agua, mientras que un mayor contenido de humedad dificulta el intercambio de gases, reduciendo la eficiencia del medio (Cavalcante et al., 2008). La densidad máxima de esporas ocurre después de 31 días de incubación. Finalmente, la concentración óptima de inóculo es del 5%. Las bajas concentraciones de inóculo retrasan la fase de latencia, mientras que las altas concentraciones aumentan la competencia por los nutrientes en el sustrato (Hamrouni et al., 2019). La reducción de la vida útil de las esporas de *Trichoderma* en el proceso de conservación está influenciada por la temperatura. La temperatura óptima de almacenamiento es de 4 °C, mientras que las altas temperaturas afectan la viabilidad de las esporas de *Trichoderma* (Serna-Díaz et al., 2020). Una dosis adecuada de esporas de cepas de *Trichoderma* permite obtener una cantidad adecuada para su uso en bioplaguicidas que mejoran la sanidad vegetal en diferentes cultivos hortícolas (Hashem et al., 2021).

El uso de dos medios de cultivo en la propagación de los hongos permite obtener cepas con diferentes características, y mediante el uso de técnicas estadísticas como PCA Biplot y GGE Biplot, podemos determinar la cepa específica de *Trichoderma* con mayor valores de crecimiento micelial y capacidad antagónica frente a patógenos del cultivo del cacao, con el fin de controlar la infección por moniliasis. El cultivo de *Trichoderma* spp. en placas con PDA nos permite obtener cepas con mejores características que las cultivadas en placas con EMA.

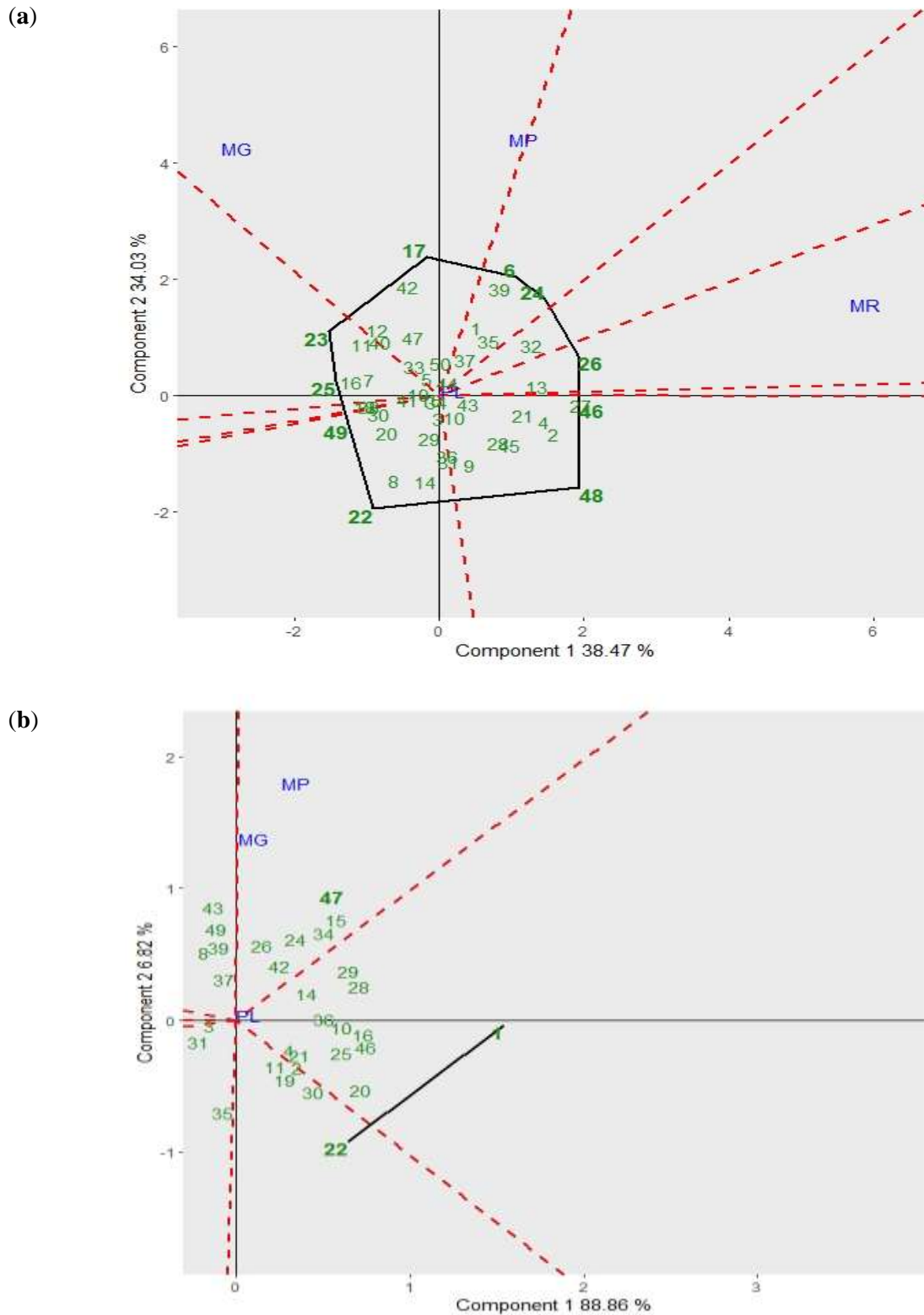


Figura 8. (a) GGE Biplot para características miceliales y capacidades antagónicas de *Trichoderma* spp. cultivadas en placas con PDA. (b) GGE Biplot para características miceliales y capacidades antagónicas de *Trichoderma* spp. crecidas en placas con EMA.

MG = crecimiento micelial, MP = capacidad antagonista (*M. permiciosa*), MR = capacidad antagonista (*M. roeri*), PL = fase de latencia. Nota: MR no se presenta en la Figura 6b.

4.2.3. Respuestas de campo de *Trichoderma* spp. contra monialisis causada por *Moniliophthora perniciosa*.

El uso de la biosolución a base de esporas de las cepas de *Trichoderma* 17, 33, 42 y 44 cultivadas en las placas de PDA mostró efectos sobre la incidencia final de monialisis de cacao, la eficiencia de los tratamientos y el rendimiento del cultivo (Tabla 1).

El tratamiento 3 presentó la menor incidencia de monialisis, de 3,1% mientras que el tratamiento Control presentó la mayor incidencia (18,2%). Por otro lado, las mayores eficiencias fueron presentados por los tratamientos 1 y 3 que mostraron valores de 70,4% y 75,1%, respectivamente; las eficiencias más bajas fueron presentaron por los tratamientos 2 y 4, con valores de 54,3 y 60,8% respectivamente. Los mayores rendimientos de cacao se obtuvieron con los tratamientos 1 y 3 que presentaron valores de 721,80 y 753,10 Kg/ha respectivamente; el menor valor de rendimiento se obtuvo con el tratamiento Control que presentó un valor de 533,50 Kg/ha.

Otros autores han presentado resultados similares Leyva et al. (2020) utilizaron cinco tratamientos basados en biosoluciones de *Trichoderma* spp. contra la pudrición de la mazorca en cacao mostrando: valores de incidencia entre 5,62 y 20,32%, eficiencias desde 38,99 hasta 71,99% y rendimientos entre 787 y 1115 Kg/ha. Loguercio et al. (2009) mostraron valores de incidencia frente a *Moniliophthora perniciosa* desde 5 hasta 78,89% mediante el uso de dos biosoluciones a base de *Trichoderma* spp. Krauss & Soberanis (2002) obtuvieron mayores rendimientos de cacao al utilizar tratamientos a base de formulaciones *Trichoderma* spp. que usando el tratamiento de control (sin la formulación de *Trichoderma* spp.). Las cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de ser agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos debido que producen metabolitos secundarios, antibióticos y micotoxinas que son capaces de degradar las estructuras resistentes de los hongos patógenos (Lyubenova et al., 2023).

Las formulaciones biológicas a base de células o esporas necesitan pasar por un proceso de estabilización del producto en almacenamiento prolongado para mantener la viabilidad de los compuestos biológicos y la funcionalidad del producto (Grzegorzczuk et al., 2018). La propagación, crecimiento y esporulación de los hongos dependen de diferentes condiciones ambientales, como el medio de cultivo, el pH, la temperatura, la luz, la humedad y la mezcla de gases atmosféricos (Jiang et al., 2022). El uso de soluciones a base de esporas de *Trichoderma* ha presentado importantes resultados en el control de diversas enfermedades de las plantas (Ruangwong et al., 2021). La aplicación de bioplaguicidas a base de esporas de *Trichoderma* es un método económico y

respetuoso con el medio ambiente contra diversas plagas, y permite obtener mayores rendimientos en diferentes cultivos, fomentando la producción de cultivos orgánicos sanos y seguros (Gunjal et al., 2023). La aplicación de esta formulación biológica en el cultivo ha demostrado que mejora la maquinaria antioxidante y tolera el estrés hídrico (Schweiger et al., 2021). Este es un predictor importante porque la elección correcta de la cepa de *Trichoderma* puede controlar la infección por moniliasis en el cacao y no genera pérdidas económicas para los agricultores.

Tabla 1. Efectos de los tratamientos con *Trichoderma* spp. contra la moniliasis causada por *Moniliophthora perniciosa*.

Tratamientos	Incidencia (%)	Eficiencia (%)	Rendimiento (kg/ha)
Control	18.2 ^a	-	533.50 ^c
T1	5.8 ^c	70.4 ^b	721.80 ^a
T2	10.1 ^b	54.3 ^c	615.20 ^b
T3	3.1 ^d	75.1 ^a	753.10 ^a
T4	9.7 ^b	60.8 ^c	630.50 ^b

Control = Tratamiento sin biosolución; T1 = Tratamiento con biosolución utilizando *Trichoderma* cepa 17; T2 = Tratamiento con biosolución utilizando *Trichoderma* cepa 33; T3 = Tratamiento con biosolución utilizando *Trichoderma* cepa 42; T4 = Tratamiento con biosolución usando *Trichoderma* cepa 44. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre los efectos de cinco tratamientos basados en *Trichoderma* spp. contra moniliasis al nivel $p < 0,05$, según prueba de Duncan, $n = 3$.

Características de la Revista en que se publicó el artículo



Nombre de Revista: Sustainability

Factor de Impacto: 3.251

Cuartil: Q1

Article

Eco-Friendly Biocontrol of Moniliasis in Ecuadorian Cocoa Using Biplot Techniques

Juan Diego Valenzuela-Cobos ¹, Fabricio Guevara-Viejó ¹, Purificación Vicente-Galindo ^{1,2,3} and Purificación Galindo-Villardón ^{1,2,4,*}

¹ Centro de Estudios Estadísticos, Universidad Estatal de Milagro (UNEMI), Milagro 091050, Ecuador

² Department of Statistics, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

³ Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), 37007 Salamanca, Spain

⁴ Centro de Investigación Institucional, Universidad Bernardo O'Higgins, Av. Viel 1497, Santiago 8370993, Chile

* Correspondence: pgalindo@usal.es; Tel.: +34-646665034

Abstract: Cocoa is the main crop in Ecuador's agricultural sector and is the most important to the country's economy. This crop is mainly threatened by moniliasis caused by *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa*. Moniliasis is a disease that causes the watery rot of cocoa beans, causing serious yield losses at crop harvest and great economic losses. In this research, we used 50 *Trichoderma* spp. cultivated in two culture media, PDA and MEA, to demonstrate mycelial growth and antagonistic capacity against two cacao-crop pathogens: *M. roreri* and *M. perniciosa*. Multivariate methods, namely a PCA biplot and a GGE biplot, indicated that four strains of *Trichoderma* spp. (17, 33, 42 and 44) cultivated on the PDA medium had the highest mycelial characteristic values and antagonistic capacities against *Moniliophthora perniciosa*. The experimental test showed that the lowest incidence of moniliasis and highest yield of cocoa occurred when using the treatments based on the *Trichoderma* spp. The results obtained in this study allow the use of strain 42 to control moniliasis in cocoa, avoiding economic losses.

Keywords: biplots; moniliasis; multivariate methods; *Trichoderma*



Citation: Valenzuela-Cobos, J.D.; Guevara-Viejó, F.; Vicente-Galindo, P.; Galindo-Villardón, P. Eco-Friendly Biocontrol of Moniliasis in Ecuadorian Cocoa Using Biplot Techniques. *Sustainability* **2023**, *15*, 4223. <https://doi.org/10.3390/su15054223>

Academic Editors: Fathiya Mbarak Khamis, Inusa Jacob Ajene and Mustafa O. Jibrin

Received: 19 January 2023
Revised: 13 February 2023
Accepted: 18 February 2023
Published: 26 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cocoa (*Theobroma cacao*), originally from South America, has already been domesticated, and is currently being produced in tropical regions of America, Africa and Asia, particularly in the Caribbean and Latin America [1]. This crop requires temperatures between 26 and 27 °C and annual rainfall between 1300 and 2800 mm to achieve higher production and a lower proliferation of pests and diseases [2]. Cocoa production employs around 6 million farmers worldwide [3]. In 2019–2020, Latin America produced 0.9 million tons of cocoa. The Ivory Coast and Ghana are responsible for the highest production (2.1 and 0.8 million tons, respectively), followed by Ecuador (0.32 million tons) [4]. In addition, Ecuador leads in the production and export of fine-aroma cocoa, with 62% of the world market. This product is highly desired due to its unique flavor characteristics [5–7].

Cocoa plantations can be seriously affected by fungal pests, such as *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa* [8], also known as moniliasis, which attack the tissues, fruits, floral cushions and buds of the plant. *Moniliophthora perniciosa* infects cocoa when the spores penetrate the meristematic tissues, including pods and flower cushions, leading to the formation of witch's broom and fruit loss [9]. *Moniliophthora roreri* causes frosty pod rot; it is found in most major cocoa-producing areas and causes serious yield losses [10]. Chemical fungicides are used to control moniliasis; however, the chemical pesticides used generate resistance in pathogens, cause damage to the environment in various forms, do not prevent the proliferation of secondary pests, and are not compatible with organic production [11]. Alternative control methods, such as biological control, have been found to reduce plant diseases as effectively as chemical fungicides [12].

Biological control in plants refers to the protection of crops using phytosanitary microorganisms that have antagonistic interactions with the pathogens that cause different diseases [13]. The main mechanisms of action of biological agents against pathogens are indirect and direct methods. Indirect methods use phytopathogenic agents that compete for nutrients and space and, in this way, invade and kill the mycelium of the antagonist. Direct methods use secondary metabolites to inhibit the growth of the pathogen. The success of the direct method is linked to the cultivation of phytosanitary microbes in the correct culture medium to stimulate the production of secondary metabolites and not allow competitive advantage against the antagonist [14].

Endophytic fungi are the most widely used biological agents against different pathogens, such as *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa*, as well as bacteria, insects and weeds. Phytopathogens have great benefits, such as their low environmental impact and protecting crops against different pests. This is in contrast to chemical pesticides, which are specific to different plant diseases [15]. *Trichoderma* is the main endophytic fungal species. It is widely known for its ability to antagonize the growth of different plant pathogens through competition for nutrients and space. Additionally, *Trichoderma* spp. produces enzymes that degrade the cell wall, such as chitinases, glucanases and proteases, to parasitize the antagonistic fungi [16]. For these reasons, it is important to evaluate the biological activities of *Trichoderma* spp. against two pathogens that affect cocoa, *M. roreri* and *M. perniciosa*, using data science techniques in order to help farmers make correct decisions.

The databases used in data science can be analyzed using big data techniques and come from different sources: experiments, the Internet or government repositories. Data science uses a series of techniques to analyze multiple variables while providing more precise information by analyzing the structure of data. The most important data science techniques are machine learning modeling, natural language processing, sentiment analysis, neural networks or deep learning analysis used in regression analysis, classification, clustering analysis, association rules, time series analysis, sentiment analysis, behavior patterns, anomaly detection, factor analysis, log analysis and deep learning using the internal structure of data. These numerical methods can be applied to considerable masses of data; they allow data scientists to establish relationships between data and detect the most significant [17]. Conventional statistical techniques have been used in the area of plant biotechnology to improve different commercial properties, such as yield and tolerance of biotic and abiotic stresses; however, reduction methods, such as PCA biplot and GGE biplot, focus on multiple variables and present them in fewer, complex variables [18].

The main goal of this research was to use the multivariate PCA biplot and GGE biplot techniques to determine the strains of *Trichoderma* spp. with the strongest mycelial characteristics and antagonistic capacities against two cocoa-crop pathogens: *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa*. Additionally, the incidence of monialisis and the efficiency of the treatment were determined using the DUNCAN test at a significance level of $p < 0.05$ between the treatments with or without biosolution based on the *Trichoderma* spp. used.

2. Materials and Methods

2.1. Fungi Strains

This study used 50 strains of *Trichoderma* spp., 1 strain of *Moniliophthora roreri* and 1 strain of *Moniliophthora perniciosa*. Strains were maintained on PDA dishes and deposited in the fungal collection of the Research and Development Laboratory of Ecuahidrolizados.

2.2. Culture Media

The PDA medium was prepared by combining 39 g of potato dextrose agar in 1 L of distilled water in an Erlenmeyer flask, whereas the MEA medium was prepared by dissolving 18 g of malt extract and 15 g of bacteriological agar in 1 L of distilled water using a flask.

In both cases, the flask was sterilized in an autoclave at 15 psi (121 °C) for 15 min. Subsequently, 10 mL of the sterile medium was poured into Petri dishes. Dishes with solidified medium were placed in plastic bags and incubated at 28 °C for 24 h to verify sterility. Next, the Petri dishes without contamination were used for the propagation of the mycelium of the fungi [19,20].

2.3. Mycelial Growth

The mycelial growth of 50 *Trichoderma* spp. on PDA dishes or MEA plates was determined using the modified Gompertz equation (Equation (1)) [21,22]:

$$\log N = A + C * \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (1)$$

Equation (1). Modified Gompertz model, where:

A, B, C = parameters of the model;

t = days;

M = day with maximum growth rate;

log N = growth kinetics.

Based on the growth kinetics, the maximum growth, μ_{\max} , (Equation (2)) and the lag time λ (Equation (3)) were calculated [21,23]:

$$\mu_{\max} = (B * C) / e \quad (2)$$

Equation (2). Maximum growth, where:

e = The Euler constant.

$$\lambda = [\ln(1 + (\mu_{\max}/v))] / \mu_{\max} \quad (3)$$

Equation (3). Lag time, where:

v = μ_{\max} .

2.4. Antagonistic Capacity

Discs 5 mm in diameter of *M. royeri* or *M. pernicioso* containing 7 days of mycelial growth were placed at one end of the Petri dishes containing PDA or MEA, 1.5 cm from the edge. Otherwise, 5-millimeter-diameter discs of *Trichoderma* spp. with 4 days of mycelial growth were placed at the opposite end of the Petri dish, and the confrontations were kept 6 cm equidistant from each other. The linear growths of the two colonies facing each other were recorded twice a day until the total colonization of the Petri dish.

The percentage of pathogen inhibition (ATP) was determined based on the radial growth of the mycelium of the pathogen controls with respect to the clashes between *Trichoderma* spp. and pathogens, using Equation (4) [24]:

$$ATP = 100 * \left[RPC - \frac{(RFP - RIP)}{RPC} \right] \quad (4)$$

Equation (4). Pathogen inhibition, where:

RPC = growth radius of the control pathogen mycelium on the final day;

RFP = growth radius of the pathogen mycelium in the presence of the antagonist on the final day;

RIP = growth radius of the mycelium of the pathogen on the day the confrontation began, even without the antagonist (culture on the seventh day).

2.5. Experimental Test

The experimentation was carried out on the “Esmeraldas” farm located in the Province of Los Ríos, which has 15-year-old cocoa plantations.

On the farm, 15 subplots were established. Each subplot was made up of 25 trees in a 5 × 5 square. The biosolution was obtained through a dose of 1 × 10⁹ conidia/mL⁻¹, and

0.2 L of the biosolution was sprayed per cocoa tree at intervals of 15 days for 5 months. The experimental design was as follows:

- Subplots 1, 2 and 3 = Control treatment without biosolution;
- Subplots 4, 5 and 6 = Treatment with biosolution using *Trichordema* strain 17 "T1";
- Subplots 7, 8 and 9 = Treatment with biosolution using the *Trichordema* strain 33 "T2";
- Subplots 10, 11 and 12 = Treatment with biosolution using the *Trichordema* strain 42 "T3";
- Subplots 13, 14 and 15 = Treatment with biosolution using the *Trichordema* strain 44 "T4".

The incidence of cocoa pods with symptoms of monialisis was determined by using Equation (5), while the efficiency of the treatment was calculated using Equation (6) [25]:

$$I = \frac{DP}{TP} \times 100 \quad (5)$$

Equation (5). Incidence of cocoa pods, where:

I = Incidence (%);

DP = Number of damaged pods;

TP = Total pods.

$$E = \frac{FIWoT - FIWT}{FIWoT} \times 100 \quad (6)$$

Equation (6). Efficiency of the treatment, where:

E = Efficiency (%);

FIWoT = Percentage of final incidence without application of *Trichoderma* spp.;

FIWT = Percentage of final incidence with application of *Trichoderma* spp.

The yield was estimated in kg of dry cocoa beans, and the dry weight was calculated as 40% of the fresh weight of the cocoa [25].

2.6. Statistical Analysis

The mycelial characteristics of maximum velocity, lag phase and the antagonistic capacity percentage of pathogen inhibition were measured in triplicates and the data were subjected to data mining techniques, such as PCA biplot and GGE biplot, using R software ver. 4.1.1.

The results of the experimental test were studied using one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the significance of individual differences at the $p < 0.05$ level, the yield of cocoa pods and the efficiency of the treatment (with or without solution). After these tests, if statistical differences were found, the Duncan test with $\alpha = 0.05$ was applied. The analyses were carried out using statistical software (Statgraphic ver. 16).

2.6.1. PCA Biplot

Principal components analysis is used in cases of continuous variable. Its purpose is to reduce the number of variables by representing the data matrix in a lower dimensionality than the original [26].

In this analysis, the centered and/or scaled matrix of rank r is approximated through its orthogonal projection of lower rank through q linear and independent vectors. These matrices represent the columns of a matrix named T , such that $T'T = 1$. The solution is to find T , which should be symmetrical and positively definite, such that it minimizes the mean squared error of the predictions $\|X_c - \hat{X}_c\|$:

$$X_c \cong X_c T T' = Z T'$$

where Z contains the main components.

If T is equal to the previous equation, its columns coincide with the eigenvectors associated with the q largest eigenvalues of the variance–covariance matrix.

In addition, if the DVS of the previous equation is considered, it is found that [27,28]:

$$X_c \cong (UDV')VV' = UDIV' = UDV'$$

2.6.2. GGE Biplot

The biplot construction procedure consists in finding the best matrix X^* of rank 2. The term GGE is the contraction of G+GE. A biplot representing the GGE of a MET dataset is called a GGE biplot. The GGE biplot model was used for phenotypic stability analysis [29]. The above equations can be written as [30]:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \theta_{ij}$$

or as:

$$Y_{ijk} - \mu - \beta_j = \alpha_i + \theta_{ij}$$

where:

Y_{ijk} = Expected yield of genotype i in environment j ;

μ = Global mean of all observations;

α_i = Main effect of genotype i ;

β_j = Main effect of environment j ;

θ_{ij} = Interaction between genotype i and environment j .

3. Results and Discussion

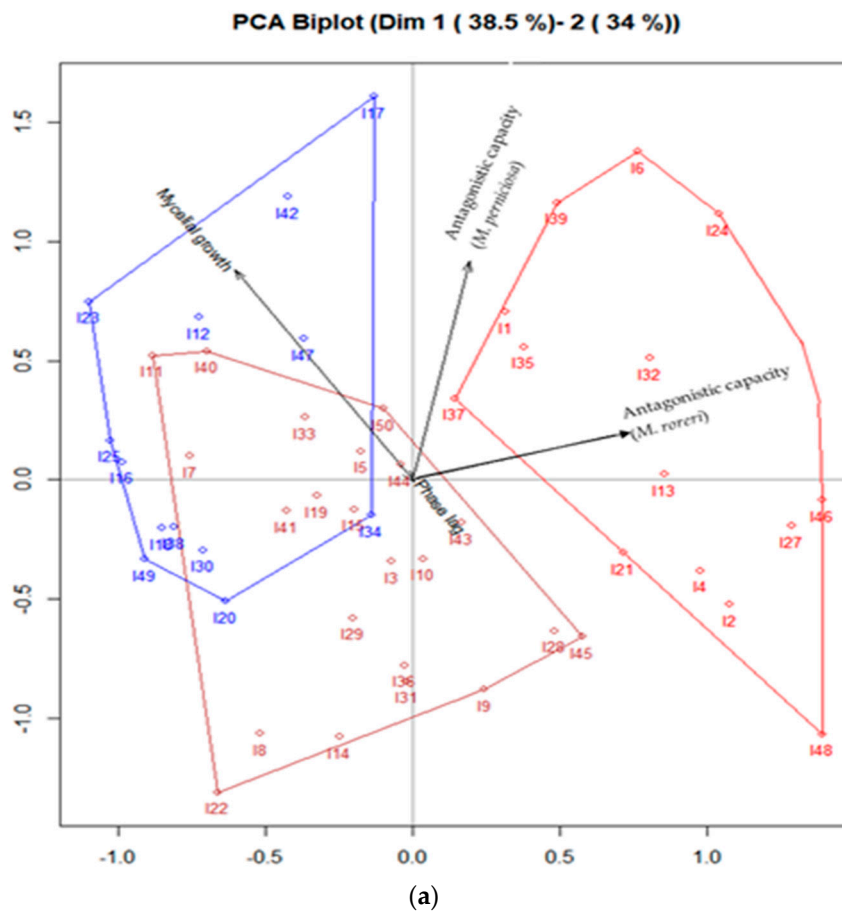
The focus of this research was to identify the *Trichoderma* spp. cultivated on two media (PDA or MEA dishes) with the highest mycelial characteristics (maximum velocity and lag phase), as well as the antagonistic capacity against two cocoa-crop pathogens: *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa*. The incidence of monialisis and the efficiency of the treatment with or without biosolution based on the *Trichoderma* spp. were calculated.

The numeration of the strains was conducted using the following distribution: 1–50: *Trichoderma* spp. cultivated on PDA dishes or *Trichoderma* spp. growth on MEA plates.

3.1. PCA Biplot Algorithm for Mycelial Characteristics and Antagonistic Capacity of *Trichoderma* spp.

Figure 1 presents the factorial graph of planes 1–2 (PCA Biplot). Figure 1a shows that the accumulated inertia amounted to 72.5%, whereas Figure 1b shows that the accumulated inertia amounted to 95.7%. Additionally, the groups were determined using the biplot coordinates based on three variables: mycelial growth, the antagonistic capacity against *Moniliophthora roreri* and the antagonistic capacity against *Moniliophthora perniciosa*.

Figure 1a shows the presence of 50 strains of *Trichoderma* cultivated on PDA plates. Cluster 1 (color red) shows the presence of 14 *Trichoderma* spp. with the strongest relation to the antagonistic capacity against *Moniliophthora roreri*. Clusters 2 and 3 (blue and brown colors, respectively) denote the presence of the 21 strains of *Trichoderma* with the highest mycelial growth. Cluster 3 (brown color) indicates the presence of the 15 *Trichoderma* spp. with the highest phase lag. On the other hand, Figure 1b shows the growth of 50 *Trichoderma* spp. on MEA dishes. Cluster 1 (red color) indicates the presence of the 20 *Trichoderma* spp. with the strongest relation to the antagonistic capacity against *Moniliophthora roreri*. Cluster 2 (brown color) shows the presence of the 10 strains of *Trichoderma* with a direct relation to the antagonistic capacity against *Moniliophthora perniciosa*. Cluster 3 (blue color) indicates the presence of the 20 *Trichoderma* spp. with the highest mycelial speed. Arzate-Vega [31] indicated that the antagonistic fungus presents greater aggressiveness towards the resistance of the phytopathogen if there are fewer days of contact.



PCA Biplot (Dim 1 (88.9%) - 2 (6.8%))

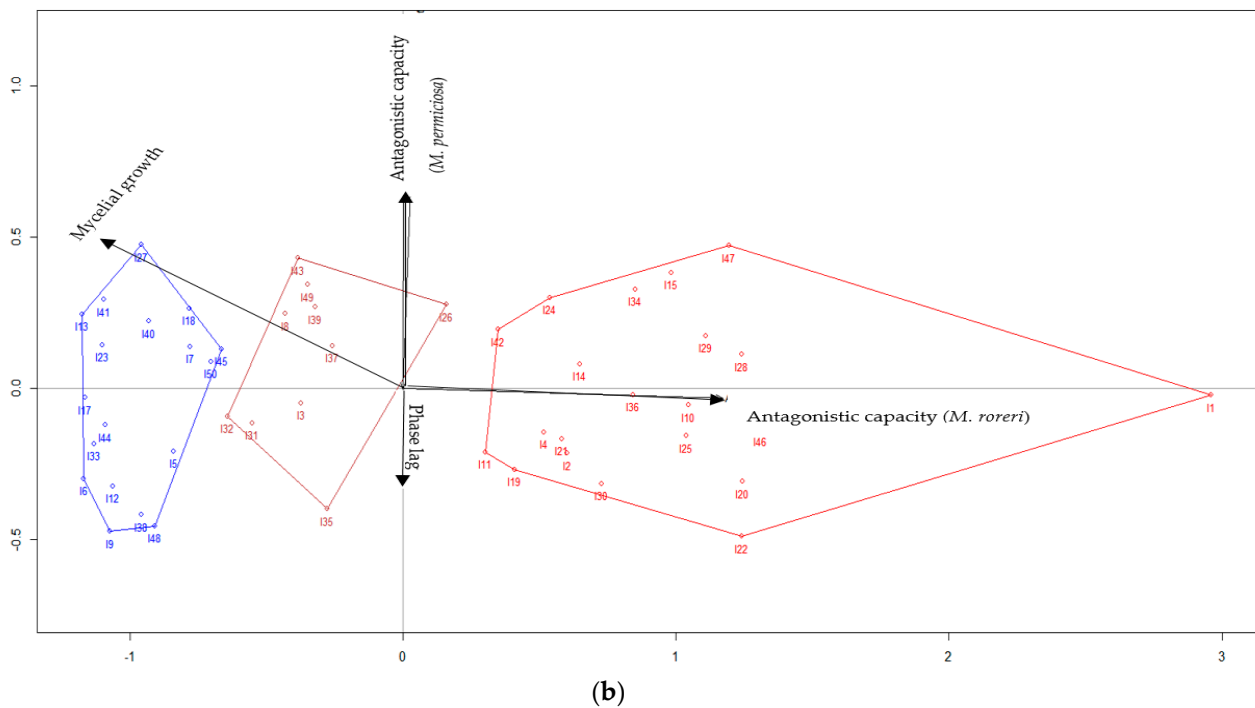


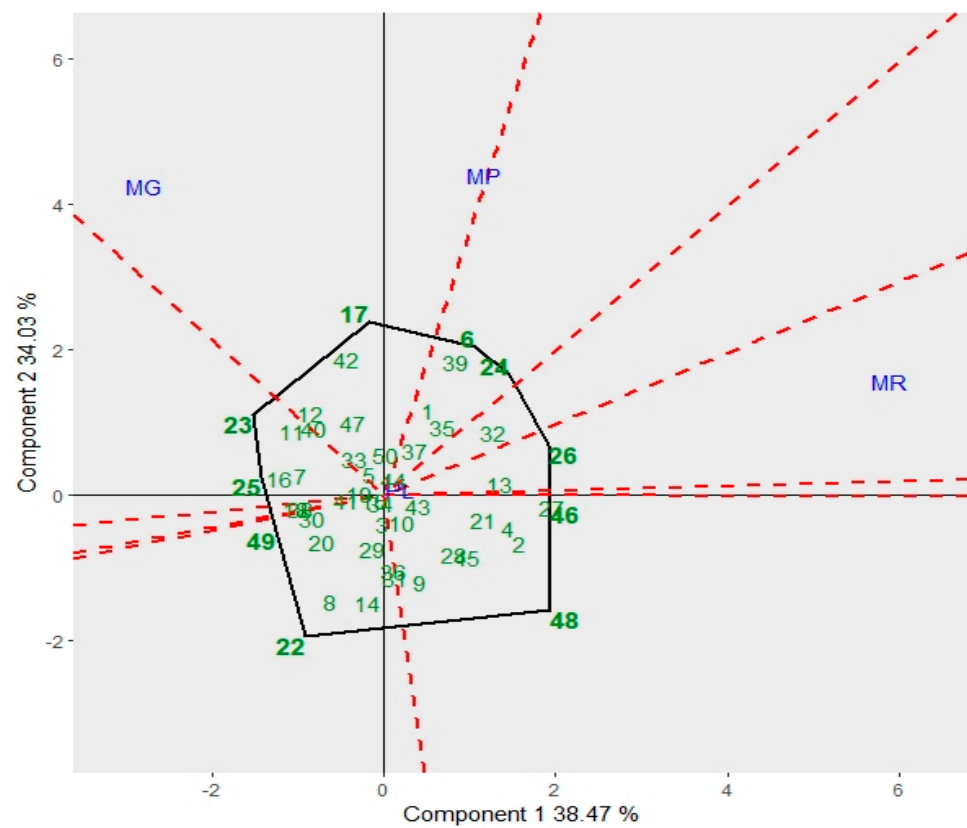
Figure 1. (a) PCA biplot for mycelial characteristics and antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. cultivated on PDA medium. (b) PCA biplot for mycelial characteristics and antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. growth on MEA medium.

The antagonistic activities of *Trichoderma* fungi against *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa* have been studied in different research works; these activities include the inhibition of the growth of these pathogens and a reduction in the symptoms of moniliasis. *Trichoderma* fungi presented an inhibition percentage of 23% for *M. roreri* and 27% for *Moniliophthora perniciosa* [32], whereas other studies showed that endophytic biocontrol agents, such as *Trichoderma* spp., are antagonists of *Moniliophthora roreri* because they germinate and penetrate the surface of the crop to establish their systems in infection, demonstrating a 23.8% reduction in the presence of moniliasis in cocoa crops [33]. In another study, seven microorganisms were isolated from the cocoa rhizosphere and their antagonism capacities were studied against the pathogen *Moniliophthora roreri*. *Trichoderma* spp. presented the highest percentage of inhibition and sporulation of *Moniliophthora roreri* [34].

Trichoderma spp. use several biological control mechanisms that can encourage plant growth and induce defense responses [35]. *Trichoderma* spp. are mainly used for bioremediation in soils with high herbicide or pesticide contents, helping to reduce these contents [36]. The implementation of this genus of fungi removes the brooms produced by *Moniliophthora perniciosa*, which prevents the spread of the disease in healthy ears and reduces the incidence of infection [37]. *Trichoderma* provides good control relative to taking no action, reducing the effects on the Ecuadorian economy of infection with this crop.

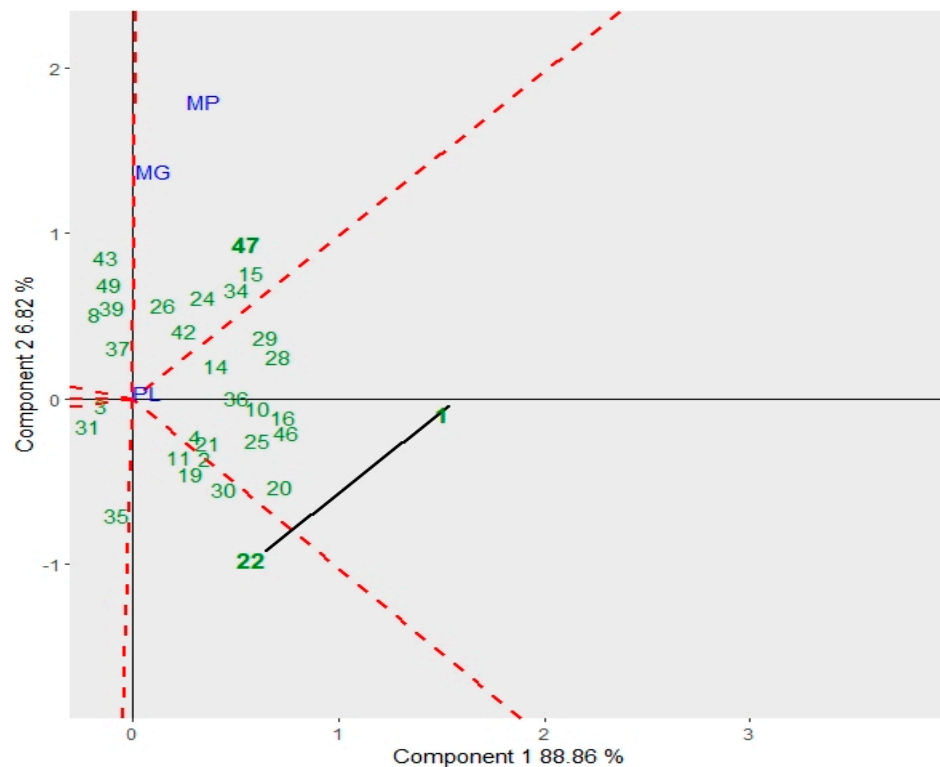
3.2. GGE Biplot for Mycelial Characteristics and the Antagonistic Capacity of *Trichoderma* spp.

Figure 2 presents the factorial graph of planes 1–2 (GGE biplot). Figure 2a shows that the accumulated inertia amounted to 72.5%, while Figure 2b indicates that the accumulated inertia amounted to 95.7%. The GGE biplot shows the *Trichoderma* strains (green color) that presented the highest values of mycelial growth and antagonistic capacity.



(a)

Figure 2. Cont.



(b)

Figure 2. (a) GGE biplot of mycelial characteristics and antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. cultivated on PDA plates. Groups of *Trichoderma* spp. showed similar characteristics (G1: 18, 30, 38); (G2: 28, 45); (G3: 15, 19, 34); (G4: 31, 36). (b) GGE biplot for mycelial characteristics and antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. growth on MEA dishes. MG = mycelial growth, MP = antagonistic capacity (*M. perniciosa*), MR = antagonistic capacity (*M. roeri*), PL = phase lag. Note: MR is not presented in Figure 2b.

Figure 2a shows the 50 strains of *Trichoderma* cultivated on the PDA plates. It was observed that nine of the *Trichoderma* strains presented a stronger relation to mycelial growth, six presented a stronger relation to the antagonistic capacity against *Moniliophthora perniciosa* and two showed a higher relation to the antagonistic capacity against *Moniliophthora roeri*. Figure 2b indicates the growth of 50 *Trichoderma* spp. on the MEA dishes. Six of these strains showed a stronger relation to mycelial growth and to the antagonistic capacity against *Moniliophthora perniciosa*. In conclusion, the PCA biplot and GGE biplot indicated that the strains 17, 33, 42 and 47 cultivated on the PDA plates presented higher values of mycelial growth and antagonistic capacity against *Moniliophthora perniciosa* in comparison with the *Trichoderma* spp. grown on the MEA dishes. The most commonly used medium in the propagation of different kinds of fungi is PDA due to its nutritional composition [38]. Different authors have indicated that fungi strains grown in this medium presented the strongest mycelial characteristics [39]. However, the use of MEA medium in the propagation of *Trichoderma* spp. was studied to obtain a low degree of sporulation. *Trichoderma* spores obtained in liquid media lose their viability due to physical factors, such as their thinner cell walls and greater number of organelles [40]. The highest spore production is obtained in solid media with the presence of a source of sugars [41]; for this reason, it is important to generate spores in solid media cultures.

Spore production is stimulated by the following factors: a solid culture medium with a high lignin content, the incubation temperature, the moisture content, the incubation period, and the inoculum concentration. The lignin present in the culture medium generates a physical–chemical barrier against microbial attack. The optimal temperature for the

maximum production of *Trichoderma* spores is 25 °C. High temperatures affect microbial growth due to alterations in the membrane structure and protein degradation, while low temperatures affect the production of spores [42]. The optimal moisture content in the culture for spore production is 65%. A lower moisture content in the culture medium reduces the solubility of nutrients and increases the surface tension of the water, whereas a higher moisture content hinders gas exchange, reducing the efficiency of the medium [43]. The maximum spore density occurs after 31 days of incubation. Finally, the optimal inoculum concentration is 5%. Low inoculum concentrations delay the lag phase, while high concentrations increase the competition for nutrients in the substrate [44]. The reduction in the useful life of the *Trichoderma* spores in the conservation process is influenced by the temperature. The optimal storage temperature is 4 °C, while high temperatures affect the viability of *Trichoderma* spores [45]. An adequate dose of spores of *Trichoderma* strains makes it possible to obtain an adequate amount for use in biopesticides that enhance plant health in different horticultural crops [46].

The use of two culture media in the propagation of the fungi makes it possible to obtain strains with different characteristics and, through the use of statistical techniques such as PCA biplot and GGE biplot, we can determinate the specific strain of *Trichoderma* with the highest values of mycelial growth and antagonistic capacity against cocoa-crop pathogens, with the aim of controlling monialisis infection. The cultivation of *Trichoderma* spp. on PDA allows us to obtain strains with better characteristics than those cultivated on MEA plates.

3.3. Field Responses of *Trichoderma* spp. against Monialisis Caused by *Moniliophthora perniciosa*

The use of the biosolution based on the *Trichoderma* spores of the strains 17, 33, 42 and 44 cultivated on the PDA plates showed effects on the final incidence of cocoa monialisis, the efficiency of the treatments and the crop yield (Table 1).

Table 1. Effect of treatments with *Trichoderma* spp. against monialisis caused by *Moniliophthora perniciosa*.

Treatment	Incidence (%)	Efficiency (%)	Yield (kg/ha)
Control	18.2 ^a	-	533.50 ^c
T1	5.8 ^c	70.4 ^b	721.80 ^a
T2	10.1 ^b	54.3 ^c	615.20 ^b
T3	3.1 ^d	75.1 ^a	753.10 ^a
T4	9.7 ^b	60.8 ^c	630.50 ^b

Control = Treatment without biosolution; T1 = Treatment with biosolution using *Trichordema* strain 17; T2 = Treatment with biosolution using *Trichordema* strain 33; T3 = Treatment with biosolution using *Trichordema* strain 42; T4 = Treatment with biosolution using *Trichordema* strain 44. Different letters in each column indicate significant differences between the effects of five treatments based on *Trichoderma* spp. against monialisis at level $p < 0.05$, according to Duncan's test, $n = 3$.

Treatment 3 presented the lowest incidence of monialisis, of 3.1%, while the control treatment showed the highest incidence (18.2%). On the other hand, the highest efficiencies were presented by treatments 1 and 3, which demonstrated values of 70.4% and 75.1%, respectively; the lowest efficiencies were presented by treatments 2 and 4, with values between 54.3 and 60.8%, respectively. The highest cocoa yields were obtained using treatments 1 and 3, which showed values of 721.80 and 753.10 Kg/ha, respectively; the lowest yield value was obtained with the control treatment, which presented a value of 533.50 Kg/ha.

Other authors have presented similar results. Leiva et al. [25] used five treatments based on *Trichordema* spp. biosolutions against frosty pod rot on cocoa trees, showing incidence values between 5.62 and 20.32%, efficiencies ranging from 38.99 to 71.99% and yields from 787 to 1115 Kg/ha. Loguercio et al. [47] showed incidence values against *Moniliophthora perniciosa* from 5 to 78.89% by using two biosolutions based on *Trichoderma* spp. Krauss and Soberanis [48] and obtained higher yields of cocoa when using treatments

based on *Trichoderma* spp. formulations than when using the control treatment (without the *Trichoderma* spp. formulation). *Trichoderma* spp. strains have the capacity to be possible biocontrol agents against phytopathogenic fungi, since they can produce secondary metabolites, antibiotics and mycotoxins that are capable of degrading the resistant structures of pathogenic fungi [49].

Biological formulations based on cells or spores need to pass through a product-stabilization process in prolonged storage in order to maintain the viability of the biological compounds and the functionality of the product [50]. The propagation, growth and sporulation of fungi are dependent on different environmental conditions, such as the culture medium, pH, temperature, light, humidity and mixture of atmospheric gases [51]. The use of solutions based on *Trichoderma* spores has presented important results in the control of various plant diseases [52]. The application of biopesticides based on *Trichoderma* spores is an economical and environmentally friendly method against various pests. Additionally, it makes it possible to obtain higher yields in different crops, encouraging the production of healthy and safe organic crops [53]. The application of this biological formulation in the crop has shown that it improves the antioxidant machinery and tolerates water stress [54]. This is an important predictor because the correct choice of *Trichoderma* strain can control moniliasis infection in cocoa and does not generate economic losses for farmers.

4. Conclusions

The cultivation of *Trichoderma* spp. on two culture media allowed us to obtain strains with different specific characteristics for use in different industrial applications.

The use of the PDA medium in the propagation of *Trichoderma* spp. allowed us to obtain strains with better characteristics than those cultivated in the MEA medium.

The multivariate techniques, PCA biplot and GGE biplot, indicated that the four strains of *Trichoderma* cultivated on the PDA medium presented the highest values of mycelial growth and antagonistic capacity against cocoa-crop pathogens.

The use of treatment 3 on the cacao trees produced the lowest incidence of moniliasis and the highest cacao yields.

Author Contributions: Conceptualization, J.D.V.-C. and F.G.-V.; formal analysis, J.D.V.-C.; investigation, F.G.-V.; methodology, J.D.V.-C. and F.G.-V.; supervision, P.V.-G. and P.G.-V.; writing—original draft, F.G.-V., J.D.V.-C., P.V.-G. and P.G.-V.; writing—review and editing, P.V.-G. and P.G.-V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is funded by the Universidad Estatal de Milagro (UNEMI) Scholarship.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Estatal de Milagro (UNEMI) and Ecuahidrolizados Industry.

Conflicts of Interest: The authors state no conflict of interest.

References

1. Ceccarelli, V.; Lastra, S.; Looor Solorzano, R.G.; Chacón, W.W.; Nolasco, M.; Sotomayor Cantos, I.A.; Plaza Avellán, L.F.; López, D.A.; Fernández Anchundia, F.M.; Dessauw, D.; et al. Conservation and use of genetic resources of cacao (*Theobroma cacao* L.) by gene banks and nurseries in six Latin American countries. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2022**, *69*, 1283–1302. [[CrossRef](#)]
2. Ramírez, C.H.E.; Gaona, O.D.J.C.; Londoño, G.A.C.; Bustamante, E.G.M. Yield of cocoa under different agroforestry systems in a dry tropical forest in western Colombia. *Bioagro* **2022**, *34*, 39–50. [[CrossRef](#)]
3. Wattnem, T.; Wiegel, J.; González, C.; Reyes, B. Who Defines Fine Chocolate? The Construction of Global Cocoa Quality Standards from Latin America. *Int. J. Sociol. Agric. Food* **2022**, *28*, 73–87.
4. García, A.; Pico, B.; Jaimez, R. La cadena de producción del Cacao en Ecuador: Resiliencia en los diferentes actores de la producción. *Novasinergia* **2021**, *4*, 152–172.

5. Villacis, A.H.; Alwang, J.R.; Barrera, V.; Dominguez, J. Prices, specialty varieties, and postharvest practices: Insights from cacao value chains in Ecuador. *AgriBus* **2022**, *38*, 426–458. [[CrossRef](#)]
6. Jensch, C.; Schmidt, A.; Strube, J. Versatile Green Processing for Recovery of Phenolic Compounds from Natural Product Extracts towards Bioeconomy and Cascade Utilization for Waste Valorization on the Example of Cocoa Bean Shell (CBS). *Sustainability* **2022**, *14*, 3126. [[CrossRef](#)]
7. Valenzuela-Cobos, J.D.; Guevara-Viejó, F.; Vicente-Galindo, P.; Galindo-Villardón, P. Food Sustainability Study in Ecuador: Using PCA Biplot and GGE Biplot. *Sustainability* **2022**, *14*, 13033. [[CrossRef](#)]
8. Armengot, L.; Ferrari, L.; Milz, J.; Velásquez, F.; Hohmann, P.; Schneider, M. Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices. *Crop Prot.* **2020**, *130*, 105047. [[CrossRef](#)]
9. Anzules-Toala, V.; Pazmiño-Bonilla, E.; Alvarado-Huamán, L.; Borjas-Ventura, R.; Castro-Cepero, V.; Julca-Otiniano, A. Control of cacao (*Theobroma cacao*) diseases in Santo Domingo de los Tsachilas, Ecuador. *Agron. Mesoam.* **2022**, *33*, 45939. [[CrossRef](#)]
10. Leiva, S.; Rubio, K.; Díaz-Valderrama, J.R.; Granda-Santos, M.; Mattos, L. Phylogenetic Affinity in the Potential Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Moniliophthora roreri*. *Agronomy* **2022**, *12*, 2052. [[CrossRef](#)]
11. Ferreira, F.V.; Musumeci, M.A. *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *37*, 90. [[CrossRef](#)]
12. Verma, A.; Johri, B.N.; Prakash, A. Antagonistic Evaluation of Bioactive Metabolite from Endophytic Fungus, *Aspergillus flavipes* KF671231. *J. Mycol.* **2014**, *2014*, 371218. [[CrossRef](#)]
13. Islam, M.R.; Juthy, P.S.; Haque, M.M.; Rahman, M.M. Identification of plant growth promoting antagonistic bacteria against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Bangladesh. *Fundam. Appl. Agric.* **2019**, *4*, 1068–1080. [[CrossRef](#)]
14. Köhl, J.; Kolnaar, R.; Ravensberg, W.J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 845. [[CrossRef](#)]
15. Ortiz, A.; Sansinenea, E. The role of beneficial microorganisms in soil quality and plant health. *Sustainability* **2022**, *14*, 5358. [[CrossRef](#)]
16. Rajani, P.; Rajasekaran, C.; Vasanthakumari, M.M.; Olsson, S.B.; Ravikanth, G.; Shaanker, R.U. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiol. Res.* **2021**, *242*, 126595. [[CrossRef](#)]
17. Sarker, I.H. Data science and analytics: An overview from data-driven smart computing, decision-making and applications perspective. *SN Comput. Sci.* **2021**, *2*, 377. [[CrossRef](#)]
18. Niazian, M.; Niedbała, G. Machine learning for plant breeding and biotechnology. *Agriculture* **2020**, *10*, 436. [[CrossRef](#)]
19. Valenzuela-Cobos, J.D.; Rodríguez-Grimón, R.O.; Zied, D.C.; Grijalva-Endara, A.; Garcés-Moncayo, M.F.; Garín-Aguilar, M.E.; Sánchez-Hernandez, A.; Valencia del Toro, G. Chemical composition and biological properties of *Pleurotus* spp. cultivated on different concentrations of peat moss and wheat straw. *Emir. J. Food Agric.* **2019**, *31*, 830–836. [[CrossRef](#)]
20. Hernández, A.A.S.; Cobos, J.D.V.; Martínez, J.H.; Arce, R.V.; Gomez, Y.d.G.y.; Segura, P.B.Z.; Aguilar, M.E.G.; Lara, H.L.; del Toro, G.V. Characterization of *Pleurotus djamor* neohaplonts recovered by production of protoplasts and chemical dedikaryotization. *3 Biotech* **2019**, *9*, 24. [[CrossRef](#)]
21. Wawrzyniak, J. Model of Fungal Development in Stored Barley Ecosystems as a Prognostic Auxiliary Tool for Postharvest Preservation Systems. *Food Bioprocess Technol.* **2021**, *14*, 298–309. [[CrossRef](#)]
22. Liu, H.; Chen, N.; Feng, C.; Tong, S.; Li, R. Impact of electro-stimulation on denitrifying bacterial growth and analysis of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model in a bio-electrochemical denitrification reactor. *Bioresour. Technol.* **2017**, *232*, 344–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cobos, J.D.V.; Páramo, D.; Aguilar, M.E.G.; Hernández, A.S.; Lara, H.L.; del Toro, G.V. Production of hybrid strains among *Pleurotus* and *Lentinula* and evaluation of their mycelial growth kinetics on malt extract agar and wheat grain using the Gompertz and Hill models. *Emir. J. Food Agric.* **2017**, *29*, 927–935.
24. Urbez-Torres, J.R.; Tomaselli, E.; Pollard-Flamand, J.; Boule, J.; Gerin, D.; Pollastro, S. Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathol. Mediterr.* **2020**, *59*, 425–439.
25. Leiva, S.; Oliva, M.; Hernández, E.; Chuquibala, B.; Rubio, K.; García, F.; Torres de la Cruz, M. Assessment of the Potential of *Trichoderma* spp. Strains Native to Bagua (Amazonas, Peru) in the Biocontrol of Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). *Agronomy* **2020**, *10*, 1376. [[CrossRef](#)]
26. Greenacre, M.; Groenen, P.J.; Hastie, T.; d’Enza, A.I.; Markos, A.; Tuzhilina, E. Principal component analysis. *Nat. Rev. Methods Primers.* **2022**, *2*, 100. [[CrossRef](#)]
27. Gabriel, K.R. The biplot-graphical display of matrices with applications to principal component analysis. *Biometrika* **1971**, *58*, 453–467. [[CrossRef](#)]
28. Galindo, M.P. Una alternativa de representación simultánea: HJ-Biplot. *Qüestió* **1986**, *10*, 13–23.
29. Khan, M.M.H.; Rafii, M.Y.; Ramlee, S.I.; Jusoh, M.; Al Mamun, M. AMMI and GGE biplot analysis for yield performance and stability assessment of selected Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) genotypes under the multi-environmental trials (METs). *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 22791. [[CrossRef](#)]
30. Burgueño, J.; Crossa, J.; Vargas, M. *SAS Programs for Graphing GE and GGE Biplot. The AMMI Analysis and Graphing the Biplot*; Biometrics and Statistics Unit CIMMYT: Mexico City, Mexico, 2001; pp. 29–36.

31. Arzate-Vega, J.; Santos-Eméstica, O.A.; Michel-Aceves, A.C.; Domínguez-Márquez, V.M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del plátano (*Musa* sp.) in vitro e invernadero. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2006**, *24*, 98–104.
32. Mejía, L.C.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Van Bael, S.; Arnold, A.E.; Hebbbar, P.; Samuels, G.J.; Robbins, N.; Herre, E.A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control* **2008**, *46*, 4–14. [[CrossRef](#)]
33. Krauss, U.; Hidalgo, E.; Bateman, R.; Adonijah, V.; Arroyo, C.; García, J.; Crozier, J.; Brown, N.; Ten Hoopen, G.M.; Holmes, K.A. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biol. Control* **2010**, *54*, 230–240. [[CrossRef](#)]
34. Villamil Carvajal, J.E.; Blanco Valbuena, J.O.; Viteri Rosero, S.E. Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* **2012**, *65*, 6305–6315.
35. Ketta, H.A.; Hewedy, O.A.E.R. Biological control of *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum* root rot disease using *Trichoderma* species. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2021**, *31*, 96. [[CrossRef](#)]
36. Nayak, P.; Solanki, H. Pesticides and Indian agriculture—A review. *Int. J. Res. Granthaalayah* **2021**, *9*, 250–263. [[CrossRef](#)]
37. Sousa Filho, H.R.; de Jesus, R.M.; Bezerra, M.A.; Santana, G.M.; de Santana, R.O. History, dissemination, and field control strategies of cocoa witches' broom. *Plant Pathol.* **2021**, *70*, 1971–1978. [[CrossRef](#)]
38. Grey, A.B.J.; Cadelis, M.M.; Diao, Y.; Park, D.; Lumley, T.; Weir, B.S.; Copp, B.R.; Wiles, S. Screening of Fungi for Antimycobacterial Activity Using a Medium-Throughput Bioluminescence-Based Assay. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 739995. [[CrossRef](#)]
39. Ochoa-Velasco, C.E.; Navarro-Cruz, A.R.; Vera-López, O.; Palou, E.; Avila-Sosa, R. Growth modeling to control (in vitro) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. *Rev. Argent. Microbiol.* **2018**, *50*, 70–74. [[CrossRef](#)]
40. Illescas, M.; Pedrero-Méndez, A.; Pitorini-Bovolini, M.; Hermosa, R.; Monte, E. Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. *Pathogens* **2021**, *10*, 991. [[CrossRef](#)]
41. Valenzuela Cobos, J.; Ramírez Grimón, R.; Vargas Farías, C.; Grijalva-Endara, A.; Mercader-Camejo, O. Biodegradation of plantain rachis using phytopathogenic fungi for composting. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **2019**, *19*, 533–541.
42. Mulatu, A.; Alemu, T.; Megersa, N.; Vetukuri, R.R. Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cavalcante, R.S.; Lima, H.L.; Pinto, G.A.; Gava, C.A.; Rodrigues, S. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technol.* **2008**, *1*, 100–104. [[CrossRef](#)]
44. Hamrouni, R.; Molinet, J.; Miché, L.; Carboué, Q.; Dupuy, N.; Masmoudi, A.; Roussos, S. Production of coconut aroma in solid-state cultivation: Screening and identification of *Trichoderma* strains for 6-pentyl-alpha-pyrone and conidia production. *J. Chem.* **2019**, *2019*, 8562384. [[CrossRef](#)]
45. Serna-Díaz, M.G.; Mercado-Flores, Y.; Jiménez-González, A.; Anducho-Reyes, M.A.; Medina-Marín, J.; Tuoh-Mora, J.S.; Téllez-Jurado, A. Use of barley straw as a support for the production of conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *26*, e00445. [[CrossRef](#)]
46. Hashem, M.; Mostafa, Y.S.; Alamri, S.; Abbas, A.M.; Eid, E.M. Exploitation of Agro-Industrial Residues for the Formulation of a New Active and Cost Effective Biofungicide to Control the Root Rot of Vegetable Crops. *Sustainability* **2021**, *13*, 9254. [[CrossRef](#)]
47. Loguercio, L.L.; de Carvalho, A.C.; Niella, G.R.; De Souza, J.T.; Pomella, A.W.V. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. *Biol. Control* **2009**, *51*, 130–139. [[CrossRef](#)]
48. Krauss, U.; Soberanis, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biol. Control* **2002**, *24*, 82–89. [[CrossRef](#)]
49. Lyubenova, A.; Rusanova, M.; Nikolova, M.; Slavov, S.B. Plant extracts and *Trichoderma* spp.: Possibilities for implementation in agriculture as biopesticides. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2023**, *37*, 159–166. [[CrossRef](#)]
50. Grzegorzczak, M.; Kancelista, A.; Łaba, W.; Piegza, M.; Witkowska, D. The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains. *Folia Microbiol.* **2018**, *63*, 433–441. [[CrossRef](#)]
51. Jiang, L.; Pettitt, T.R.; Buenfeld, N.; Smith, S.R. A critical review of the physiological, ecological, physical and chemical factors influencing the microbial degradation of concrete by fungi. *Build. Environ.* **2022**, *214*, 108925. [[CrossRef](#)]
52. Ruangwong, O.-U.; Pornsuriya, C.; Pitija, K.; Sunpapao, A. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 against Postharvest Anthracnose of Chili Pepper. *J. Fungi.* **2021**, *7*, 276. [[CrossRef](#)]
53. Gunjal, A.B. *Trichoderma*: An Eco-Friendly Biopesticide for Sustainable Agriculture. In *Organic Farming for Sustainable Development*; Apple Academic Press: Palm Bay, FL, USA, 2023; pp. 3–21.
54. Schweiger, R.; Padilla-Arizmendi, F.; Nogueira-López, G.; Rostás, M.; Lawry, R.; Brown, C.; Hampton, J.; Steyaert, J.M.; Müller, C.; Mendoza-Mendoza, A. Insights into metabolic changes caused by the *Trichoderma virens*-maize root interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2021**, *34*, 524–537. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO V

**TÉCNICAS ESTADÍSTICAS MULTIVARIANTES:
NUEVO ENFOQUE PARA IDENTIFICAR LAS
PROPIEDADES COMERCIALES DE MEZCLAS DE
LENTINULA EDODES Y CÁSCARA DE CACAO**

CAPÍTULO V

5. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS MULTIVARIANTES: NUEVO ENFOQUE PARA IDENTIFICAR LAS PROPIEDADES COMERCIALES DE MEZCLAS DE *LENTINULA EDODES* Y CÁSCARA DE CACAO

5.1. Metodología

Los datos utilizados en este artículo científico se obtuvieron de forma experimental por el autor de esta tesis y con los técnicos de la Empresa Ecuahidrolizados S.A.S.

5.1.1. Producción de cuerpos fructíferos

Se cultivaron cepas de *Lentinula edodes* utilizando hojas de plátano, que es un importante desecho agrícola ecuatoriano y se utiliza como ingrediente en la mezcla del sustrato.

Los cuerpos fructíferos de las 50 cepas de *Lentinula edodes* se obtuvieron a partir de una mezcla de residuos agrícolas como: aserrín de roble, paja de trigo, semilla de mijo, cascarilla de semilla de algodón y CaCO_3 . Las condiciones de fructificación fueron humedad relativa entre 85 y 90%, temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, recirculación de aire y un período de iluminación de 12 h (Valenzuela-Cobos et al., 2019c). Los cultivos para cada cepa de *Lentinula edodes* se realizaron por triplicado.

5.1.2. Preparación de las mezclas

La cáscara de la mazorca de cacao es uno de los principales subproductos de la industria alimentaria ecuatoriana que se genera por la alta producción de chocolate fino.

Las cáscaras de mazorcas de cacao (CPH) se recolectaron de la Agrofinca Sánchez-Jaramillo en la Provincia de Manabí. Los CPH se colocaron en agua hirviendo durante 10 min para inactivar las enzimas, los cuerpos fructíferos de los hongos y la cáscara de la mazorca de cacao se expusieron a la luz solar directa hasta que se secaron.

Los hongos y el CPH se molieron a polvo en un molino de paletas durante 30 s y se pasaron por un tamiz de 200 μm de malla obteniendo harina de hongo o harina de cáscara de la mazorca de cacao (CPHF) respectivamente, y las harinas se almacenaron a 4°C .

5.1.3. Composición de las mezclas

Las mezclas estaban compuestas por las siguientes formulaciones:

Mezcla 1 = 60 % de harina de hongos de una cepa específica de *Lentinula edodes* mezclada con 40 % de CPHF; Mezcla 2 = 80 % de harina de hongos de una cepa específica de *Lentinula edodes* mezclada con 20 % de CPHF.

5.1.4. Composición química

Los parámetros químicos analizados de las mezclas fueron: humedad por el método del horno, proteínas (Nx6.25) por el método de Kjeldahl, grasa por el aparato Soxhlet, fibra dietética total (FDT) por el método enzimático-gravimétrico, las cenizas por la técnica de calcinación, y los carbohidratos se determinaron utilizando la Ecuación 9 (Guevara-Viejó et al., 2021a):

$$C = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ FDT} + \% \text{ contenido de cenizas}) \quad (9)$$

Ecuación 9. Porcentaje de carbohidratos en las mezclas.

5.1.5. Propiedades comerciales

Las propiedades comerciales calculadas de las mezclas de harinas fueron: capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana, pH y actividad de agua (a_w).

5.1.6. Capacidad antioxidante

El extracto de las mezclas de harina se analizó para determinar la capacidad antioxidante, se mezclaron 30 μL del extracto y 270 μL de metanol en una placa de 96 pozos. La mezcla del extracto con etanol se incubó en la oscuridad durante 30 min y luego se midió a 515 nm utilizando un lector de microplacas. La actividad de eliminación de radicales (RSA) de DPPH se determinó utilizando la Ecuación 10 (Valenzuela-Cobos et al., 2023).

$$RSA(\%) = \frac{ADPPH - AS}{ADPPH} \times 100 \quad (10)$$

Ecuación 10. Actividad de eliminación de radicales DPPH (RSA).

5.1.7. Actividad antioxidante

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando las siguientes bacterias Gram-positivas: *Salmonella typhimurium* (ABN 572). La bacteria está depositada en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Ecuahidrolizados.

Se utilizó solución salina con una concentración de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL para ajustar las suspensiones bacterianas. Los extractos de las mezclas de harina se disolvieron en etanol al 30%, luego se mezclaron con caldo de soya tréptico ($1,0 \times 10^5$ UFC por pocillo) en un volumen final de 100 μ L (Guevara-Viejó et al., 2021b).

Adicionalmente, se midió el pH de las mezclas con un medidor de pH 400 (Spectrum Technologies Inc. USA) diluyendo las mezclas en agua destilada (1:10), y se midió la actividad de agua (a_w) de las mezclas con un Labmaster AW (Novasina AG, Suiza) a 25 °C (Tsukatani et al., 2012).

5.1.8. Prueba de análisis sensorial

La prueba de evaluación sensorial fue realizada por 50 panelistas durante el lapso de 1 hora mediante una encuesta que utiliza 9 puntos: 1= me disgusta muchísimo, 2= me disgusta mucho, 3= me disgusta moderadamente, 4= me disgusta poco, 5= nada me gusta ni me disgusta, 6= me gusta poco, 7= me gusta moderadamente, 8= me gusta mucho, 9= me gusta extremadamente. Los parámetros sensoriales evaluados fueron: color, aroma, textura y aceptabilidad general (Delgado-Ospina et al., 2021; Uriarte-Frías et al., 2021).

5.1.9. Análisis estadístico

La composición química y características comerciales: humedad, proteínas, grasas, fibra dietética total (FDT), cenizas, carbohidratos, capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana, pH y actividad de agua (a_w) se midieron por triplicado, y los datos se sometieron a análisis de técnicas estadísticas multivariante como: GGE Biplot y PCA Biplot usando el software R ver 4.1.1.

Además, los resultados obtenidos de la encuesta de análisis sensorial fueron tabulados y posteriormente examinados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) al nivel de $p < 0,05$, para determinar diferencias significativas entre parámetros sensoriales como: color, aroma, textura y aceptabilidad. Si se encontraron diferencias estadísticas, se aplicó la prueba de Duncan con $\alpha = 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo

usando software estadístico (Statgraphic ver. 16).

5.1.10. GGE Biplot

El gráfico GGE Biplot se utiliza para obtener la visualización del mejor comportamiento de un determinado genotipo en cada ambiente. Se realiza interconectando todos los genotipos que se encuentran en los puntos extremos del gráfico y sus respectivas líneas perpendiculares, formando un polígono. Este polígono muestra el mejor genotipo para cada ambiente y divide los ambientes en diferentes grupos.

En caso de que los genotipos se adapten a diferentes grupos ambientales y la variación entre grupos sea mayor que dentro del grupo, se forma un megaambiente, que indica los genotipos que tienen una adaptación amplia o específica a determinados ambientes o grupos de ambientes. .

El modelo GGE Biplot mantiene juntos a G y GE, y divide a GGE en dos términos multiplicativos, por lo tanto, la ecuación viene dada por (Silva et al., 2012; Yan & Kang, 2002).

$$Y_{ij} = \mu + e_j + \lambda_1 \gamma_{i1} \alpha_{j1} + \lambda_2 \gamma_{i2} \alpha_{j2}$$

donde:

Y_{ij} = El desempeño del genotipo i en el ambiente j

μ = Promedio mundial

e_j = Efecto del medio ambiente j

λ_1 = Valor propio del primer componente principal

λ_2 = Valor propio del segundo componente principal

γ_{i1} = Autovectores del genotipo i asociados al primer componente

γ_{i2} = Autovectores del genotipo i asociados al segundo componente

α_{j1} = Autovectores ambientales j para el primer componente

α_{j2} = Autovectores ambientales j para el segundo componente

ε_{ij} = Error experimental

5.1.11. PCA Biplot

El PCA Biplot permite obtener un conjunto de datos estandarizados para extraer

los patrones principales de los grupos potenciales y explorar las correlaciones entre los indicadores objetivos. PCA biplot disminuye la cantidad de data y muestra la posición relativa de cada indicador en un cuadrante de los ejes del plano.

El método PCA Biplot aproxima la matriz X por $U_{(q)nxq}$, con una factorización adecuada, obteniendo consecuentemente la expresión (Gabriel, 1971):

$$X \cong X_{(q)} \cong U \sum VT \cong E_{(q)} G_{(q)}^T$$

donde, $E_{(q)}$ y $G_{(q)}$ son matrices de rango completo, definidas como:

$$E_{(q)} = U_{(q)} \sum_{(q)}^p$$

y

$$G_{(q)} = V_{(q)} \sum_{(q)}^{1-p}$$

dependiendo del valor seleccionado para p ($0 \leq p \leq 1$).

5.2. Resultados y discusiones

La investigación consistió en identificar las mezclas de harina con las más altas características químicas y propiedades comerciales de harina de *Lentinula edodes* y CPHF.

Las muestras de las mezclas de harinas se realizaron siguiendo la siguiente distribución:

1–50: Muestras de harina correspondientes a la Mezcla 1 (60 % de harina de hongos de una cepa específica de *Lentinula edodes* mezclada con 40 % de CPHF) o muestras de harina correspondientes a la Mezcla 2 (80 % de harina de hongos de una cepa específica de *Lentinula edodes* mezclada con 20 % CPHF).

5.2.1. Algoritmo Estadístico para características químicas de las mezclas de harinas

Los gráficos de GGE Biplot presentaron la composición química de las mezclas de harinas correspondientes a las mezclas 1 y 2. La Figura 9a presenta el GGE Biplot con una inercia acumulada de 79,37%, mientras que la Figura 9b muestra el GGE Biplot con una inercia acumulada de 82,98%. Los clústers se han formado utilizando seis variables tales como: humedad, proteínas, grasas, fibra dietética total (FDT), cenizas y carbohidratos.

La Figura 9a indica que 8 muestras de las harinas de la Mezcla 1 (5, 6, 8, 13, 20, 26, 28, 36) presentaron mayor contenido de proteína, humedad y grasa, 4 muestras de las harinas de la Mezcla 1 (1, 17, 24, 37) presentaron mayor contenido de fibra dietética total (FDT), 8 muestras de la Mezcla 1 (10, 18, 21, 31, 32, 34, 46, 47) mostraron los valores más altos de carbohidratos, y 1 muestra de la Mezcla 1 (30) indicó el mayor valor de ceniza. Por otro lado, la Figura 9b señala que 13 muestras de las harinas de la Mezcla 2 (2, 4, 5, 7, 13, 14, 27, 30, 32, 37, 44, 45, 48) presentaron mayor contenido de proteína, humedad y grasa, y 13 muestras de las harinas de la Mezcla 2 (3, 12, 18, 20, 22, 25, 26, 28, 29, 40, 41, 42, 43) mostraron los valores más altos de ceniza y fibra dietética total (FDT).

Los hongos *Lentinula edodes* son una fuente considerable de proteína vegetal y fibra dietética de alta calidad. La producción de proteína vegetal es sumamente económica en comparación con la proteína de origen animal, los alimentos de origen vegetal no están asociados a riesgos para la salud humana como enfermedades cardiovasculares y cáncer de colon. La fibra mantiene las funciones normales en el cuerpo humano (Chen et al., 2015; Su et al., 2017; Wolfe et al., 2018). Por otro lado, CPH es una fuente principal de nutrientes: proteínas, grasas, fibra dietética total (FDT), cenizas y carbohidratos (Barrios-Rodríguez et al., 2022). Las propiedades tecnológicas de los productos alimenticios están relacionadas con las interacciones químicas entre las proteínas, los lípidos y la fibra con las moléculas de agua y aceite (Campos-Vega et al., 2018). El alto contenido de fibra en los alimentos a base de CPH aumenta la ingesta de alimentos y disminuye la digestibilidad aparente, debido a que el tránsito de los alimentos a través del tracto gastrointestinal se ve reducido por la presencia de este macronutriente (Liu et al., 2010).

El uso de dos ingredientes diferentes en las mezclas como son: harina de hongos *Lentinula edodes* y harina de mazorca de cacao que presentan altos valores de proteína y fibra permite obtener nuevos productos alimenticios con una importante composición

nutricional, favoreciendo el cultivo de los hongos *Lentinula edodes* y también el uso de un subproducto como la mazorca del cacao en la industria alimentaria.

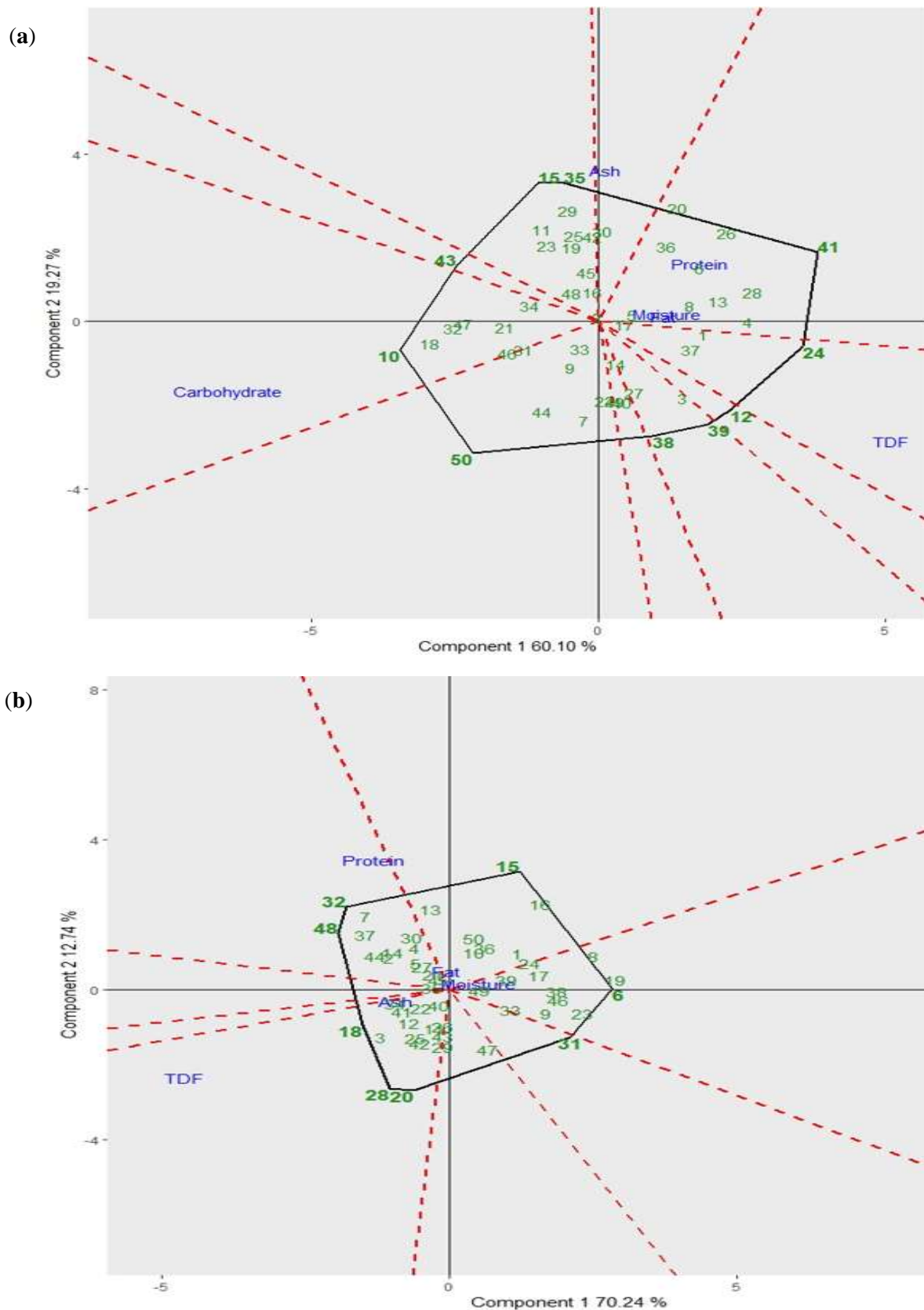


Figura 9. (a) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a las características químicas, (b) GGE Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a las características químicas.

5.2.2. Algoritmo Estadístico para propiedades comerciales de las mezclas de harinas

La Figura 10 presentó la formación de 3 clústers utilizando cuatro variables como son: capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana, pH y actividad del agua (a_w). La Figura 10a indica el PCA Biplot con una inercia acumulada del 57,7 %, mientras que la Figura 10b muestra el PCA Biplot con una inercia acumulada del 55 %.

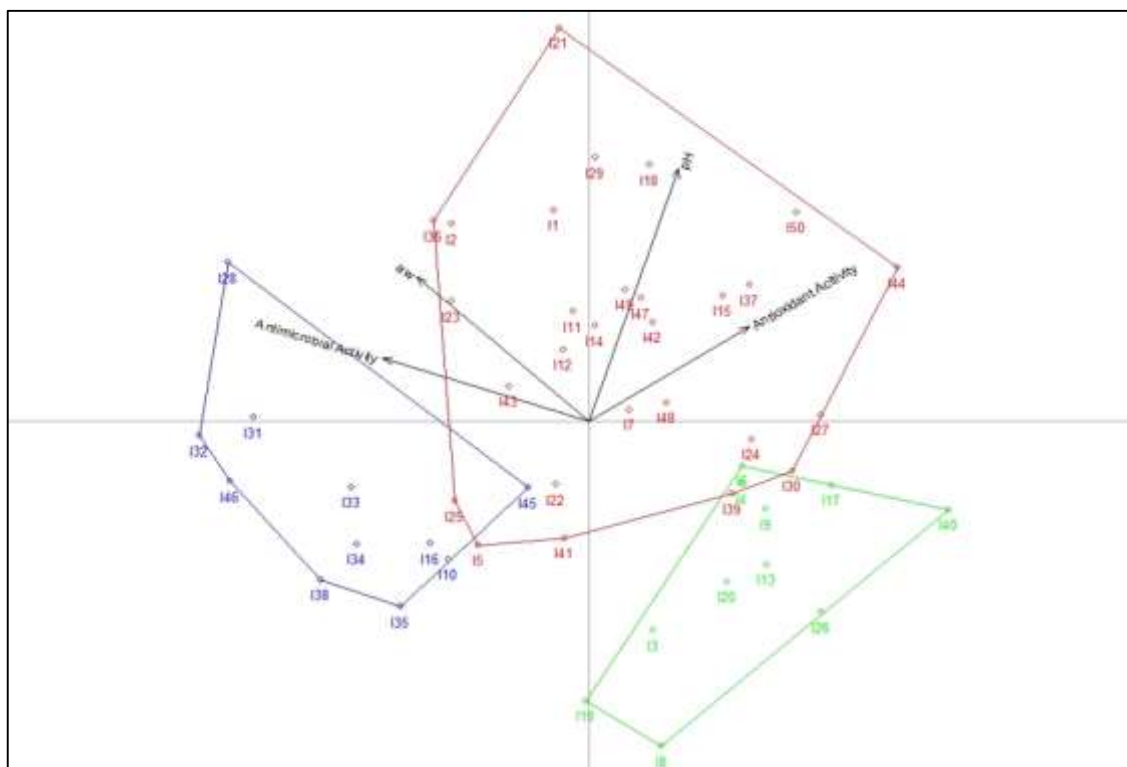
La Figura 10a indica la presencia de 2 clústers importantes de muestras de la Mezcla 1: El Clúster 1 “color azul” formado por 11 muestras (10, 16, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 45, 46) que presentaron mayor relación con la actividad antimicrobiana, y el Clúster 2 “color rojo” formado por 28 muestras (1, 2, 5, 7, 11, 12, 14, 15, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 36, 37, 39, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50) mostraron los valores más altos de actividad antimicrobiana, pH y actividad de agua (a_w). Por lo otro lado, la Figura 10b señala la presencia de 3 grandes clústers de muestras de la Mezcla 2: Clúster 1 “color rojo” formado por 15 muestras (1, 2, 4, 7, 23, 24, 27, 31, 32, 33, 35, 43, 44, 48, 50) que mostraron mayor relación con la actividad del agua (a_w), el Clúster 2 “color verde” formado por 22 muestras (3, 5, 10, 11, 12, 13, 18, 19, 21, 25, 26, 28, 29, 30, 36, 37, 38, 41, 42, 45, 46, 47) mostraron los valores más altos de actividad antimicrobiana y pH, y el Clúster 3 “color azul” formado por 12 muestras (6, 8, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 34, 39, 40, 49) presentó valores más altos de actividad antioxidante.

Lentinula edodes es un hongo comestible que contiene polifenoles y polisacáridos que indican una alta capacidad antioxidante (Yang et al., 2019). Los antioxidantes previenen la formación de radicales libres y otros compuestos que dañan el ADN, los lípidos, las proteínas y otras biomoléculas (Barros et al., 2007). Además, estudios han mostrado resultados similares sobre la efectividad de la actividad antimicrobiana de extractos acuosos de *Lentinula edodes* contra bacterias Gram Positivas. La capacidad antimicrobiana está relacionada con el contenido total de fenoles y orto-difenoles que se producen en los diferentes extractos (acuoso o metanol), y también los compuestos fenólicos dependen de las características morfológicas y genéticas de la cepa del hongo (García et al., 2021). En la actualidad, *Lentinula edodes* es conocida por su importancia en el área farmacéutica, especialmente como prevención de la hipercolesterolemia y la diabetes (Spim, et al., 2021). Adicionalmente, la harina de mazorca de cacao ha presentado compuestos como: PCA (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), epicatequina y procianidinas que se relacionan con la capacidad antioxidante (Vargas-Arana et al., 2022).

Diferentes investigaciones han demostrado la eficacia de los extractos metanólicos de la cáscara de la mazorca de cacao frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus* y Gram negativas como *E. coli*, obteniendo valores superiores en el metanol soluble en comparación con el acetato de etilo soluble (Yahya et al., 2021). La capacidad de inhibición de la cáscara de la mazorca de cacao frente a las bacterias está influenciada por los componentes fenólicos que actúan sobre la pared celular de las bacterias provocando la muerte del microorganismo. Además, el efecto de inhibición está relacionado con los compuestos hidrofílicos que rodean las proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Santacruz & Medrano, 2021). El valor de pH es una variable que influye en la obtención de pectina y por tanto en las propiedades fisicoquímicas de los alimentos. La pectina permite mejorar la textura y la estabilidad en los productos alimenticios (Indiarito et al., 2021).

GGE y PCA Biplots mostraron que las muestras de harina de las mezclas 1 y 2 que se obtuvieron de los cuerpos fructíferos de la cepa de *Lentinula edodes* 13 mezclados con cáscara de mazorca de cacao mostraron valores importantes de composición nutricional, actividad antimicrobiana y antioxidante, y pH que son importantes para la formulación de nuevos productos, y también se puede utilizar en el sector farmacéutico.

(a)



(b)

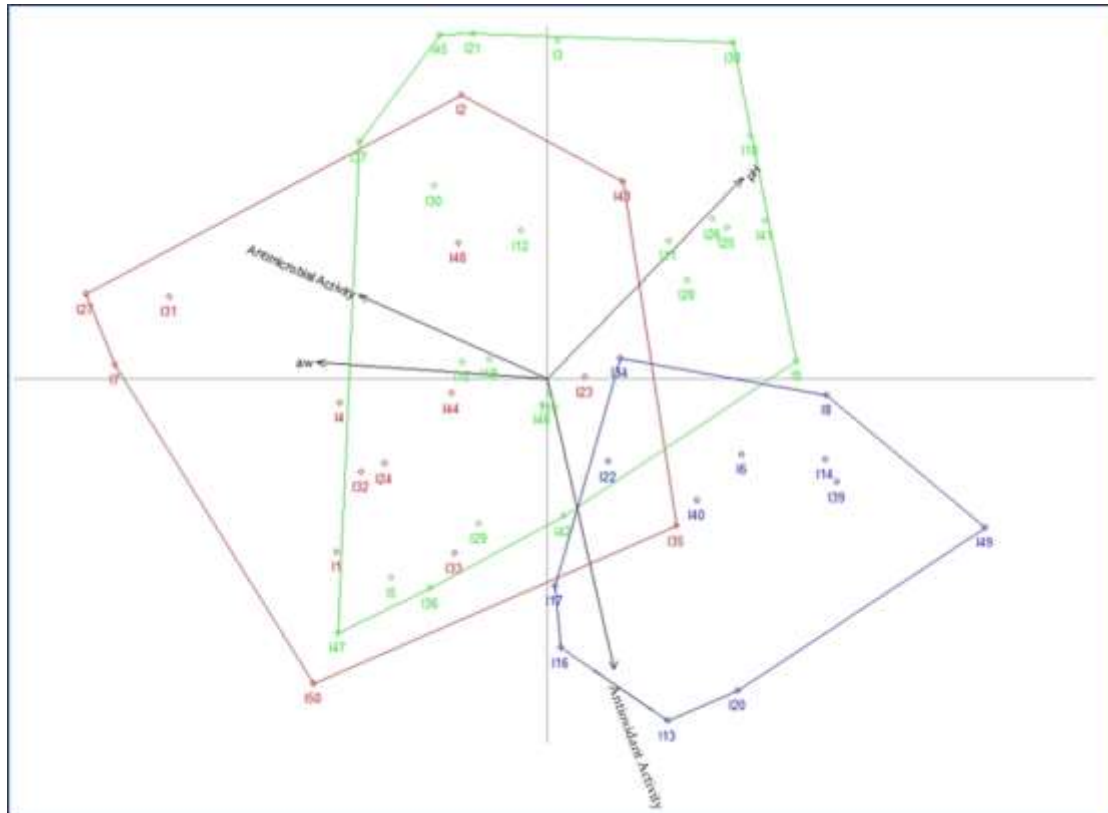


Figura 10. (a) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 1 correspondientes a propiedades comerciales, (b) PCA Biplot para muestras de harina de la Mezcla 2 correspondientes a propiedades comerciales.

5.2.3. Características sensoriales de las mezclas de harinas

La Tabla 2 presenta los resultados de la prueba sensorial que realizaron 50 panelistas a muestras de la mezcla 1 (60% harina de hongos de *Lentinula edodes* cepa 13 mezclada con 40% harina de mazorca de cacao) y muestras de la mezcla 2 (80% harina de hongos de *Lentinula edodes* cepas 13 mezcladas con 20% de harina de cáscara de mazorca de cacao) utilizando encuestas basadas en escalas hedónicas de nueve puntos: 1= me disgusta extremadamente, 2= me disgusta mucho, 3= me disgusta moderadamente, 4= me disgusta levemente, 5= ni me gusta ni me disgusta , 6= me gustó poco, 7= me gustó moderadamente, 8= me gustó mucho, 9= me gustó muchísimo. Los panelistas indicaron que el aroma no presentó diferencia estadística entre las dos mezclas de harinas, mientras que los panelistas indicaron que sí presentaron diferencias estadísticas entre atributos de color y de textura, dando preferencia a la muestra de harina de la mezcla 2. Finalmente, los panelistas mostraron diferencia estadística en cuanto a la aceptabilidad en general, indicando preferencia por la muestra de la mezcla 2 (80% harina de hongos de *Lentinula*

edodes cepas 13 mezcladas con 20% de harina de cáscara de mazorca de cacao).

Los hongos *Lentinula edodes* presentan compuestos volátiles: alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, compuestos azufrados y pirazinas que contribuyen a la calidad y sabor de los nuevos alimentos (Yu et al., 2021). Los compuestos volátiles se producen en el procesamiento de alimentos mediante reacciones químicas como: oxidación y degradación de lípidos, reacción de Maillard o reacciones de caramelización (Zhou et al., 2022). Los hongos *Lentinula edodes* secos tienen aroma tostado o aroma a ajo, por lo que pueden ser utilizados para el desarrollo e investigación de productos en la industria alimentaria. Actualmente, los cuerpos fructíferos de los hongos se evalúan en la industria de los condimentos por su sabor. El alto contenido de compuestos de ocho carbonos, azufre y aldehídos que presentan en su composición los cuerpos fructíferos de *Lentinula edodes* provienen del sustrato de aserrín que se utiliza en su cultivo (Li et al., 2019). Los resultados en las pruebas sensoriales indicaron que las preferencias de olor y masticabilidad más altas entre los panelistas cuando los productos alimenticios tenían en su composición una mayor cantidad de hongos *Lentinula* (Xie et al., 2023). Las harinas de mazorca de cacao presentan compuestos aromáticos volátiles cuando se someten a procesos térmicos debido a la formación de sustancias como: metilpirazinas y nitrógeno heterocíclico responsables del aroma dulce y fuerte, xantinas y teobromina relacionadas con la cafeína y sabores amargos respectivamente. En otra investigación, los consumidores informaron una aceptabilidad general del color oscuro de la cáscara de la mazorca de cacao en la producción de nuevos alimentos (Rocha et al., 2017). La cáscara de la mazorca de cacao ha presentado características como aditivos funcionales en productos cárnicos como las salchichas de cerdo (Choi et al., 2019).

Los resultados obtenidos por los 50 panelistas que realizaron la evaluación sensorial indicaron que la muestra de harina de la mezcla 2 (80% harina de hongos de la cepa *Lentinula* 13 y con 20% harina CPH) presentó parámetros sensoriales superiores a la muestra de harina de la mezcla 1.

Tabla 2. Evaluación de la calidad sensorial de las mezclas de harinas

Atributos Sensoriales	Mezcla 1	Mezcla 2
Aroma	8.1 ± 0.75 ^a	8.3 ± 0.63 ^a
Color	6.4 ± 0.83 ^b	8.5 ± 0.42 ^a
Textura	7.2 ± 0.67 ^b	7.9 ± 1.10 ^a
Aceptabilidad	7.0 ± 0.91 ^b	8.1 ± 1.10 ^a

Mezcla 1= 60% harina de hongos de Lentinula edodes cepa 13 mezclada con 40% harina de cáscara de mazorca de cacao; Mezcla 2= 80% harina de hongos de Lentinula edodes cepa 13 mezclada con 20% harina de cáscara de mazorca de cacao. Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas entre los atributos sensoriales a nivel $p < 0.05$, según prueba de Duncan, $n = 50$ panelistas.

Características de la Revista en que se envió el artículo

Nombre de Revista: Journal of Fungi

Factor de Impacto: 5.724

Cuartil: Q1

Proceso: En revisión

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El primero y el tercer artículo tienen un gran impacto en la transferencia de conocimiento puesto que se centran en la economía circular alimenticia del Ecuador y su papel en el desarrollo sostenible.
2. El trabajo Avances en la Economía Circular del Ecuador. Una estrategia para la sostenibilidad basada en Métodos BIPLLOT investiga el poder alimenticio de los subproductos del cacao mezclados con soya, demostrando que las mezclas en una proporción adecuada garantizan los niveles proteicos y el sabor agradable imprescindible para el consumo humano.
3. El trabajo Avances en la Economía Circular del Ecuador. Una estrategia para la sostenibilidad basada en Métodos BIPLLOT investiga las mezclas de subproductos de cacao con hongos, de la especie *Lentinula edodes*, como alternativa alimenticia para los ecuatorianos, presentando excelentes resultados, similares a los encontrados en las mezclas con soya.
4. El uso de los subproductos del cacao en la alimentación humana mezclados con productos tradicionales como la soya, o los hongos, supondrá una reducción de costos considerable para la economía del país y un impacto trascendental a la sostenibilidad agrícola del mismo, ya que el cacao contribuye directamente al PIB del Ecuador por ser el tercer productor de mayor exportación.
5. La proporción en la que se usan los alimentos cacao y soya es muy importante para conseguir valores nutricionales y farmacéuticos óptimos, tal como hemos demostrado en esta investigación. Lo mismo sucede en las mezclas con hongos.
6. El segundo artículo recoge el aporte de controlar el impacto de 2 patógenos, que generan la enfermedad del cacao conocida como monialisis. Se demuestra que las cepas de *Trichoderma* crecidas en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA) presentaron mayor efectividad contra los 2 patógenos, en comparación con las cepas de *Trichoderma* cultivadas en el medio agar extracto de malta (EMA).

7. Las cepas de *Trichoderma* cultivadas en medio compuesto de agar dextrosa y papa (PDA) presentaron los valores más altos de crecimiento micelial, en comparación con las cepas crecidas en medio compuesto de agar extracto de malta (EMA).

8. Las tres investigaciones realizadas en esta tesis doctoral prueban la importancia que tiene la economía circular en Ecuador y su impacto económico y social, aprovechando la cáscara del cacao, que anteriormente suponía un problema de desechos, como un nutriente combinado con soya o con hongos, reduce los costes de alimentación y protege la salud del individuo, por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Toda la investigación tiene como eje vertebral de análisis, los métodos Biplot, que han permitido caracterizar las interacciones genotipo ambiente y encontrar las mezclas óptimas de los subproductos de cacao con especies de hongos, o con variedades de soya, que son más nutritivas para la población ecuatoriana.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron recomendar lo siguiente:

1. Ecuador es un país cuyo segundo producto de exportación se encuentra dentro del campo agrícola, por lo que es necesario el estudio de otros productos alimenticios diferentes a los presentados en esta tesis con la finalidad de tecnificar este sector de gran importancia económica.
2. Los resultados obtenidos en esta investigación permite inferir que otros tipos de productos pertenecientes a otros sectores productivos pueden ser estudiados mediante el uso de técnicas estadísticas multivariantes.

BIBLIOGRAFÍAS

BIBLIOGRAFÍAS

- Afzal, M.; Alghamdi, S.S.; Migdadi, H.H.; El-Harty, E. & Al-Faifi, S.A. (2022). Agronomical and Physiological Responses of Faba Bean Genotypes to Salt Stress. *Agriculture*, 12, 235.
- Amor-Esteban, V.; Galindo-Villardón, M.P., & García-Sánchez, I.M. (2018). Industry mimetic isomorphism and sustainable development based on the X-STATIS and HJ-biplot methods. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 26192-26208.
- Ansarifard, I.; Mostafavi, K.; Khosroshahli, M.; Reza Bihamta, M., & Ramshini, H. (2020). A study on genotype–environment interaction based on GGE biplot graphical method in sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.). *Food Science & Nutrition*, 8, 3327-3334.
- Arzate-Vega, J.; Santos-Eméstica, O.A.; Michel-Aceves, A.C. & Domínguez-Márquez, V.M. (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del plátano (*Musa* sp.) in vitro e invernadero. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 24, 98–104.
- Barrios-Rodríguez, Y.F.; Salas-Calderón, K.T.; Orozco-Blanco, D.A.; Gentile, P. & Girón-Hernández, J. (2022). Cocoa Pod Husk: A High-Pectin Source with Applications in the Food and Biomedical Fields. *ChemBioEng Rev*, 9, 462-474.
- Barros, L.; Baptista, P.; Correia, D.M.; Morais, J.S. & Ferreira, I.C.F.R. (2007). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4781–4788.
- Botella-Martínez, C.; Lucas-Gonzalez, R.; Ballester-Costa, C.; Pérez-Alvarez, J.A.; Fernández-López, J.; Delgado-Ospina, J.; Chaves-López, C. & Viuda-Martos, M. (2021) Ghanaian Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells Coproducts: Effect of Particle Size on Chemical Composition, Bioactive Compound Content and Antioxidant Activity. *Agronomy*, 11, 401.
- Burgueño, J.; Crossa, J. & Vargas, M. (2001). *SAS Programs for Graphing GE*

- and GGE Biplot. *The AMMI Analysis and Graphing the Biplot*; Biometrics and Statistics Unit CIMMYT: Mexico City, Mexico, pp. 29–36.
- Campos-Vega, R.; Nieto-Figueroa, K.H. & Oomah, B.D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends Food Sci. Technol.*, *81*, 172–184.
- Carrasco, G., Molina, J.L.; Patino-Alonso, M.C.; Castillo, M.D.C.; Vicente-Galindo, M.P., & Galindo-Villardón, M.P. (2019). Water quality evaluation through a multivariate statistical HJ-Biplot approach. *Journal of Hydrology*, *577*, 123993.
- Cavalcante, R.S.; Lima, H.L.; Pinto, G.A.; Gava, C.A. & Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technol.*, *1*, 100–104.
- Chafla, A.L.; Rodríguez, Z.; Boucourt, R. & Torres, V. (2016). Bromatological characterization of cocoa shell (*Theobroma cacao*), from seven cantons of the Amazonia, Ecuador. *Cuba. J. Agric. Sci.*, *50*, 245-252.
- Chen, W.C.; Li, W.; Yang, Y.; Yu, H.L.; Zhou, S.; Feng, J.; Li, X.B. & Liu, Y.F. (2015). Analysis and evaluation of tasty components in the pileus and stipe of *lentinula edodes* at different growth stages. *J. Agric. Food Chem.*, *63*, 795–801.
- Chen, Z.; Gao, H.; Wu, W.; Chen, H.; Fang, X.; Han, Y. & Mu, H. (2021). Effects of fermentation with different microbial species on the umami taste of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Lwt*, *141*, 110889.
- Choi, J.; Kim, N.; Choi, H.Y. & Han, Y.S. (2019). Effect of cacao bean husk powder on the quality properties of pork sausages. *Food Sci. Anim. Resour.*, *39*, 742–755.
- Cobos, J.D.V.; Viejó, F.G.; Cobo, J.C.; Sulca, R.L.; Verdugo, D.N.; Moncayo, M.F.G.; Endara, A.G. (2021). Chemical and productivity characterization of parental and hybrid strains of *Lentinula edodes* cultivated in different agricultural residues. *Emir. J. Food Agric.*, *33*, 260-265.
- De Barros, H.E.A.; Natarelli, C.V.L.; Tavares, I.M.D.C.; De Oliveira, A.L.M.; Araújo, A.B.S.; Pereira, J.; Carvalho, E.E.N.; de Barros Vilas Boas, E.V. & Franco, M. (2020). Nutritional Clustering of Cookies Developed with Cocoa Shell, Soy, and Green Banana Flours Using Exploratory Methods. *Food Bioprocess Technol.*, *13*, 1566–1578.

- Delgado-Ospina, J.; Martuscelli, M.; Grande-Tovar, C.D.; Lucas-González, R.; Molina-Hernandez, J.B.; Viuda-Martos, M.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.Á. & Chaves-López, C. (2021). Cacao Pod Husk Flour as an Ingredient for Reformulating Frankfurters: Effects on Quality Properties. *Foods*, *10*, 1243.
- De Luna, M.D.G.; Budianta, W.; Rivera, K.K.P. & Arazo, R.O. (2017). Removal of sodium diclofenac from aqueous solution by adsorbents derived from cocoa pod husks. *J Environ Chem Eng.*, *5*, 1465–1474.
- Eswaran, S.; Muir, J. & Chey, W.D. (2013). Fiber and functional gastrointestinal disorders. *Am. J. Gastroenterol.*, *108*, 718–727.
- Evans, S.J. (2010). *Chocolate Unwrapped: Taste & Enjoy the World's Finest Chocolate*, 1st ed.; Pavillion: Shoreham, UK; p. 240.
- Frutos Bernal, E.; Martín del Rey, A. & Galindo Villardón, P. (2020). Analysis of madrid metro network: From structural to HJ-biplot perspective. *Applied Sciences*, *10*, 5689.
- Gabriel, K.R. (1971). The biplot-graphical display of matrices with applications to principal component analysis. *Biometrika*, *58*, 453–467.
- Gabriel, K.R (1972). Analysis of meteorological data by means of canonical decomposition and biplots. *J. Appl. Meteor.*, *11*, 1071-1077.
- Galindo, M.P. (1986). Una alternativa de representación simultánea: HJ-Biplot. *Qüestió*, *10*, 13–23.
- Garcia, J.; Afonso, A.; Fernandes, C.; Nunes, F.M.; Marques, G. & Saavedra, M.J. (2021). Comparative antioxidant and antimicrobial properties of *Lentinula edodes* Donko and Koshin varieties against priority multidrug-resistant pathogens. *S. Afr. J. Chem. Eng.*, *35*, 98-106.
- Gardner-Lubbe, S.; Le Roux, N. J. & Gowers, J. C. (2008). Measures of fit in principal component and canonical variate analyses. *Journal of Applied Statistics*, *35*, 947-965.
- Greenacre, M.; Groenen, P.J.; Hastie, T.; d'Enza, A.I.; Markos, A. & Tuzhilina, E. (2022). Principal component analysis. *Nat. Rev. Methods Primers.*, *2*, 100.
- Grey, A.B.J.; Cadelis, M.M.; Diao, Y.; Park, D.; Lumley, T.; Weir, B.S. & Copp, B.R.; Wiles, S. Screening of Fungi for Antimycobacterial Activity Using a Medium-Throughput Bioluminescence-Based Assay. (2021).

- Grzegorzczak, M.; Kancelista, A.; Łaba, W.; Piegza, M. & Witkowska, D. (2018). The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains. *Folia Microbiol*, 63, 433–441.
- Gower, J.C.; Lubbe, S. & Le Roux, N.J. (2011). *Understanding Biplots*; John Wiley & Sons: Chichester, UK.
- Guevara-Viejó, F.; Valenzuela-Cobos, J.D.; Vicente-Galindo, P. & Galindo-Villardón, P. (2021a) Application of K-Means Clustering Algorithm to Commercial Parameters of *Pleurotus* spp. Cultivated on Representative Agricultural Wastes from Province of Guayas. *J. Fungi*, 7, 537.
- Guevara-Viejó, F.; Valenzuela-Cobos, J.D.; Vicente-Galindo, P. & Galindo-Villardón, P. (2021b). Data-Mining Techniques: A New Approach to Identifying the Links among Hybrid Strains of *Pleurotus* with Culture Media. *J. Fungi*, 7, 882.
- Guevara-Viejó, F.; Valenzuela-Cobos, J.D.; Grijalva-Endara, A.; Vicente-Galindo, P. & Galindo-Villardón, P. (2022a). Data Mining Techniques: New Method to Identify the Effects of Aquaculture Binder with Sardine on Diets of Juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Sustainability*, 14, 4203.
- Guevara-Viejó, Fabricio. (2022b). Contribuciones a la minería de datos basadas en herramientas multivariantes de Cluster para el tratamiento de Big Data. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Guillermo, J.C.; García-Cedeño, A.; Rivas-Lalaleo, D.; Huerta, M. & Clotet, R. (2018). IoT Architecture based on Wireless Sensor Network Applied to Agricultural Monitoring: A Case of Study of Cacao Crops in Ecuador. In *Proceedings of the International Conference of Information and Communication Technologies for Adapting Agriculture to Climate Change II*, Cali, Colombia, 21–23 November.
- Guler, C.; Thyne, G.D.; McCray, J.E. & Turner, A.K. (2002). Evaluation of graphical and multivariate statistical methods for classification of water chemistry data. *Hydrogeol. J.*, 10, 455–474.
- Gunjal, A.B. (2023). *Trichoderma*: An Eco-Friendly Biopesticide for Sustainable Agriculture. In *Organic Farming for Sustainable Development*; Apple Academic Press: Palm Bay, FL, USA, pp. 3–21.

- Gyedu-Akoto, E.; Yabani, D.; Sefa, J. & Owusu, D. (2015). Natural skin-care products: the case of soap made from cocoa pod husk potash. *Adv. Res.*, *4*, 365-370.
- Handojo, L. & Indarto, A. (2020). Cocoa bean skin waste as potential raw material for liquid smoke production. *Environ. Technol.*, *41*, 1044–1053.
- Hashem, M.; Mostafa, Y.S.; Alamri, S.; Abbas, A.M. & Eid, E.M. (2021). Exploitation of Agro-Industrial Residues for the Formulation of a New Active and Cost Effective Biofungicide to Control the Root Rot of Vegetable Crops. *Sustainability*, *13*, 9254.
- Hernández, A.A.S.; Cobos, J.D.V.; Martínez, J.H.; Arce, R.V.; Gomez, Y.d.G.y.; Segura, P.B.Z.; Aguilar, M.E.G.; Lara, H.L. & del Toro, G.V. (2019). Characterization of *Pleurotus djamor* neohaplonts recovered by production of protoplasts and chemical dedikaryotization. *3 Biotech*, *9*, 24.
- Illescas, M.; Pedrero-Méndez, A.; Pitorini-Bovolini, M.; Hermosa, R. & Monte, E. (2021). Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. *Pathogens*, *10*, 991.
- Indiarto, R.; Raihani, Z.; Dewi, M. & Zsahra, A. (2021). A Review of Innovation in Cocoa Bean Processing By-Products. *Int. J.*, *9*, 1162-1169.
- Jensch, C.; Schmidt, A & Strube, J. (2022). Versatile Green Processing for Recovery of Phenolic Compounds from Natural Product Extracts towards Bioeconomy and Cascade Utilization for Waste Valorization on the Example of Cocoa Bean Shell (CBS). *Sustainability*, *14*, 3126.
- Jiang, L.; Pettitt, T.R.; Buenfeld, N. & Smith, S.R. (2022). A critical review of the physiological, ecological, physical and chemical factors influencing the microbial degradation of concrete by fungi. *Build. Environ.*, *214*, 108925.
- Ketta, H.A. & Hewedy, O.A.E.R. (2021) Biological control of *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum* root rot disease using *Trichoderma* species. *Egypt. J. Biol. Pest Control*, *31*, 96.
- Khan, M.M.H.; Rafii, M.Y.; Ramlee, S.I.; Jusoh, M. & Al Mamun, M. (2021). AMMI and GGE biplot analysis for yield performance and stability assessment of selected Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) genotypes under the multi-environmental trials (METs). *Sci. Rep.*, *11*,

- Kostic, M.; Smiljkovic, M.; Petrovic, J.; Glamocilija, J.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R.; Ciric, A. & Sokovic, M. (2017). Chemical, nutritive composition and wide-broad bioactive properties of honey mushroom *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer. *Food Funct.*, 8, 3239–3249.
- Kongor, J.E.; Hinneh, M.; de Walle, D.V.; Afoakwa, E.O.; Boeckx, P. & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile: A review. *Food Res. Int.*, 82, 44–52.
- Krauss, U. & Soberanis, W. (2002). Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biol. Control*, 24, 82–89.
- Krauss, U.; Hidalgo, E.; Bateman, R.; Adonijah, V.; Arroyo, C.; García, J.; Crozier, J.; Brown, N.; Ten Hoopen, G.M. & Holmes, K.A. (2010). Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biol. Control*, 54, 230–240.
- Kumar, P.; Eid, E.M.; Al-Huqail, A.A.; Širić, I.; Adelodun, B.; Abou Fayssal, S.; Valadez-Blanco, R.; Goala, M.; Ajibade, F.O. & Choi, K.S.; et al. (2022). Kinetic Studies on Delignification and Heavy Metals Uptake by Shiitake (*Lentinula edodes*) Mushroom Cultivated on Agro-Industrial Wastes. *Horticulturae*, 8, 316.
- Leiva, S.; Oliva, M.; Hernández, E.; Chuquibala, B.; Rubio, K.; García, F. & Torres de la Cruz, M. (2020). Assessment of the Potential of *Trichoderma* spp. Strains Native to Bagua (Amazonas, Peru) in the Biocontrol of Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). *Agronomy*, 10, 1376.
- Li, W.; Wang, J.; Chen, W.; Yang, Y.; Zhang, J.; Feng, J.; Yu, H. & Li, Q. (2019). Analysis of volatile compounds of *Lentinula edodes* grown in different culture substrate formulations. *Food Res. Int.*, 125, 108517
- Liu, Q.; Feng, Z.Y.; Gong, P.B. & Yan, S.X. (2010). Effects of high-fiber food on food intake and digestibility in the lesser rice-field rat (*Rattus losea*). *Acta Theriol. Sin.*, 30, 291–296.
- Liu, H.; Chen, N.; Feng, C.; Tong, S. & Li, R. (2017). Impact of electro-stimulation on denitrifying bacterial growth and analysis of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model in a bio-

- electrochemical denitrification reactor. *Bioresour. Technol.*, 232, 344–353.
- Loguercio, L.L.; de Carvalho, A.C.; Niella, G.R.; De Souza, J.T. & Pomella, A.W.V. (2009). Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. *Biol. Control*, 51, 130–139.
- Lu, F.; Rodriguez-Garcia, J.; Van Damme, I.; Westwood, N.J.; Shaw, L.; Robinson, J.S.; Warren, G.; Chatzifragkou, A.; McQueen Mason, S. & Gomez, L.; et al. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 14, 80–88.
- Lyubenova, A.; Rusanova, M.; Nikolova, M. & Slavov, S.B. (2023). Plant extracts and *Trichoderma* spp.: Possibilities for implementation in agriculture as biopesticides. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 37, 159–166.
- Mansur, D.; Tago, T.; Masuda, T. & Abimanyu, H. (2014). Conversion of cacao pod husks by pyrolysis and catalytic reaction to produce useful chemicals. *Biomass Bioenergy*, 66, 275–285.
- Martínez-Regalado, J. A.; Murillo-Avalos, C.L.; Vicente-Galindo, P.; Jiménez-Hernández, M. & Vicente-Villardón, J.L. (2021). Using HJ-Biplot and external logistic biplot as machine learning methods for corporate social responsibility practices for sustainable development. *Mathematics*, 9, 2572.
- Mejía, L.C.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Van Bael, S.; Arnold, A.E.; Hebbar, P.; Samuels, G.J.; Robbins, N. & Herre, E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control*, 46, 4–14.
- Mihai, R.A.; Abarca, P.A.L.; Romero, B.A.T.; Florescu, L.I.; Catană, R. & Kosakyan, A. (2022). Abiotic Factors from Different Ecuadorian Regions and Their Contribution to Antioxidant, Metabolomic and Organoleptic Quality of *Theobroma cacao* L. Beans, Variety “Arriba Nacional”. *Plants*, 11, 976.
- Mora, J.R. (2016). Técnicas estadísticas multivariadas para la tipificación de sistemas de producción ganadera. *Revista Tumbaga*, 1.
- Moreno-Miranda, C.; Jordán, J.; Moreno-Miranda, R.; Moreno, P. & Solis, J. (2019). Protected designation of origin and sustainability characterization: The case of PDO cocoa Arriba. *Agriculture*, 9, 229.

- Morphet, C.S. (1997). A statistical method for the identification of spatial clusters. *Environ. Plan A*, 29, 1039–1055.
- Mulatu, A.; Alemu, T.; Megersa, N. & Vetukuri, R.R. (2021). Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling. *Microorganisms*, 9, 1675.
- Nayak, P. & Solanki, H. (2021). Pesticides and Indian agriculture—A review. *Int. J. Res. Granthaalayah*, 9, 250–263.
- Niazian, M. & Niedbała, G. (2020). Machine learning for plant breeding and biotechnology. *Agriculture*, 10, 436.
- Notarnicola, B.; Sala, S.; Anton, A.; McLaren, S.J.; Saouter, E. & Sonesson, U. (2017). The role of life cycle assessment in supporting sustainable agri-food systems: A review of the challenges. *J. Clean. Prod.*, 140, 399–409.
- Ochoa-Velasco, C.E.; Navarro-Cruz, A.R.; Vera-López, O.; Palou, E. & Avila-Sosa, R. (2018). Growth modeling to control (in vitro) *Fusarium verticillioides* and *Rhizopus stolonifer* with thymol and carvacrol. *Rev. Argent. Microbiol.*, 50, 70–74.
- Oduro-Mensah, D.; Ocloo, A.; Nortey, T.; Antwi, S.; Okine, L.K & Adamafo, N.A. (2020). Nutritional value and safety of animal feed supplemented with *Talaromyces verruculosus*-treated cocoa pod husks. *Scientific Reports*, 10, 13163.
- Olakunle, M.O.; Inyinbor, A.A.; Dada, A.O. & Bello, O.S. (2018). Combating dye pollution using cocoa pod husks: a sustainable approach. *Int J Sustainable Eng.*, 11, 4–15.
- Oyedele, O.F. & Lubbe, S. (2015). The construction of a partial least-squares biplot. *Journal of Applied Statistics*, 42, 2449-2460.
- Parola, S.; Chiodaroli, L.; Orlandi, V.; Vannin, C. & Panno, L. (2017). *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*: Functional food with antioxidant—Antimicrobial activity and an important source of Vitamin D and medicinal compounds. *Funct. Foods Health Dis.*, 7, 773.
- Redgwell, R.; Trovato, V.; Merinat, S.; Curti, D.; Hediger, S. & Manez, A. (2003). Dietary fibre in cocoa shell: Characterisation of component polysaccharides. *Food Chem.*, 81, 103–112.
- Rocha, I.S.; Santana, L R.R.D.; Soares, S.E. & Bispo, E.D.S. (2017). Effect of

- the roasting temperature and time of cocoa beans on the sensory characteristics and acceptability of chocolate. *Food Sci. Technol.*, 37, 522-530.
- Rajo-Poveda, O.; Barbosa-Pereira, L.; Zeppa, G. & Stevigny, C. (2020). Cocoa Bean Shell-A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients*, 12, 1123.
- Rosal Chicas, J.A. & Alberto, A.C. (2017). Técnicas estadísticas de análisis multivariante aplicadas a la interpretación de variables del cambio climático. *Rev. Iberoam. Bioecon. Cambio Clim.*, 3, 652 – 668.
- Royse, D.J.; Baars, J. & Tan, Q. (2017). Current Overview of Mushroom Production in the World. In *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*; Zied, D.C., Pardo-Giménez, A., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, pp. 5–13.
- Ruangwong, O.-U.; Pornsuriya, C.; Pitija, K. & Sunpapao, A. (2021). Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 against Postharvest Anthracnose of Chili Pepper. *J. Fungi.*, 7, 276.
- Santacruz, S. & Medrano, P. (2021). Use of phenolic compounds from cocoa pod-husks (*Theobroma cacao* L.) as inhibitors of *Salmonella* spp. in fresh cheese produced in Manabí, Ecuador. *Rev Fac Nac Agron Medellin*, 74, 9715-9722.
- Sarker, I.H. (2021). Data science and analytics: An overview from data-driven smart computing, decision-making and applications perspective. *SN Comput. Sci.*, 2, 377.
- Schweiger, R.; Padilla-Arizmendi, F.; Nogueira-López, G.; Rostás, M.; Lawry, R.; Brown, C.; Hampton, J.; Steyaert, J.M.; Müller, C. & Mendoza-Mendoza, A. (2021). Insights into metabolic changes caused by the *Trichoderma virens*-maize root interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 34, 524–537.
- Serna-Díaz, M.G.; Mercado-Flores, Y.; Jiménez-González, A.; Anducho-Reyes, M.A.; Medina-Marín, J.; Tuoh-Mora, J.S. & Téllez-Jurado, A. (2020). Use of barley straw as a support for the production of conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Rep.*, 26, e00445.
- Silva, R.R. & Benin, G. (2012). Análises Biplot: conceitos, interpretações e aplicações. *Ciência Rural*, 42, 1404-1412.

- Sharma, A.; Yadav, R.; Sheoran, R.; Kaushik, D.; Mohanta, T.K.; Sharma, K.; Yadav, A.; Dhanda, P.S. & Kaushik, P. (2023). Estimation of Heterosis and the Combining Ability Effect for Yield and Its Attributes in Field Pea (*Pisum sativum* L.) Using PCA and GGE Biplots. *Horticulturae*, 9, 256.
- Shojaei, S.H.; Mostafavi, K.; Bihamta, M.R.; Omrani, A.; Mousavi, S.M.N.; Illés, Á.; Bojtor, C. & Nagy, J. (2022). Stability on Maize Hybrids Based on GGE Biplot Graphical Technique. *Agronomy*, 12, 394.
- Sousa Filho, H.R.; de Jesus, R.M.; Bezerra, M.A.; Santana, G.M. & de Santana, R.O. (2021). History, dissemination, and field control strategies of cocoa witches' broom. *Plant Pathol.*, 70, 1971–1978.
- Spim, S.R.V.; Castanho, N.; Pistila, A.M.H.; Jozala, A.F.; Oliveira Junior, J.M. & Grotto, D. (2021). *Lentinula edodes* mushroom as an ingredient to enhance the nutritional and functional properties of cereal bars. *J. Food Sci. Technol.*, 58, 1349–1357.
- Su, C.H.; Lai, M.-N. & Ng, L.T. (2017). Effects of different extraction temperatures on the physicochemical properties of bioactive polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Food Chem.*, 220, 400–405.
- Tejada-Tovar, C.; Villabona-Ortíz, A.; González-Delgado, Á.D.; Granados-Conde, C. & Jiménez-Villadiego, M. (2019). Kinetics of mercury and nickel adsorption using chemically pretreated cocoa (*Theobroma cacao*) husk. *Trans ASABE*, 62, 461–466.
- Tejedor-Flores, N.; Vicente-Galindo, P., & Galindo-Villardón, P. (2017). Sustainability multivariate analysis of the energy consumption of Ecuador using MuSIASEM and BILOT approach. *Sustainability*, 9, 984.
- Tsukatani, T.; Suenaga, H.; Shiga, M.; Noguchi, K.; Ishiyama, M.; Ezoe, T. & Matsumoto, K. (2012). Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 90, 160–166.
- Urbez-Torres, J.R.; Tomaselli, E.; Pollard-Flamand, J.; Boule, J.; Gerin, D. & Pollastro, S. (2020). Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathol. Mediterr.*, 59, 425–439.
- Uriarte-Frías, G.; Hernández-Ortega, M.M.; Gutiérrez-Salmeán, G.; Santiago-Ortiz, M.M.; Morris-Quevedo, H.J. & Meneses-Mayo, M. (2021). Pre-

- Hispanic Foods Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*), Nopal (*Opuntia ficus-indica*) and Amaranth (*Amaranthus* sp.) as New Alternative Ingredients for Developing Functional Cookies. *J. Fungi*, 7, 911.
- Valenzuela-Cobos, J.D.; Páramo, D.; Aguilar, M.E.G.; Hernández, A.S.; Lara, H.L. & del Toro, G.V. (2017). Production of hybrid strains among *Pleurotus* and *Lentinula* and evaluation of their mycelial growth kinetics on malt extract agar and wheat grain using the Gompertz and Hill models. *Emir. J. Food Agric.*, 29, 927–935.
- Valenzuela-Cobos, J.D.; Rodríguez-Grimón, R.O.; Zied, D.C.; Grijalva-Endara, A.; Garcés-Moncayo, M.F.; Garín-Aguilar, M.E.; Sánchez-Hernandez, A. & Valencia del Toro, G. (2019a). Chemical composition and biological properties of *Pleurotus* spp. cultivated on different concentrations of peat moss and wheat straw. *Emir. J. Food Agric.*, 31, 830–836.
- Valenzuela Cobos, J.; Ramírez Grimón, R.; Vargas Farías, C.; Grijalva-Endara, A. & Mercader-Camejo, O. (2019b). Biodegradation of plantain rachis using phytopathogenic fungi for composting. *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 19, 533–541.
- Valenzuela-Cobos, J.D.; Vásquez-Véliz, G.K.; Zied, D.C.; Franco-Hernández, O.M.; Sánchez-Hernández, A.; Garín-Aguilar, M. E.; Leal-Lara, H. & Valencia Del Toro, G. (2019c). Bioconversion of agricultural wastes using parental, hybrid and reconstituted strains of *Pleurotus* and *Lentinula*. *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 18, 647-657.
- Valenzuela-Cobos, J.D.; Lazo-Sulca, R.; Noriega-Verdugo, D.; Garcés, M. & Grijalva-Endara, A. (2021). Biodegradation of cocoa shell by phytopatogenic fungi for *Pleurotus ostreatus* production. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 20, 381-388.
- Valenzuela-Cobos, J.D.; Guevara-Viejó, F.; Vicente-Galindo, P. & Galindo-Villardón, P. (2023). Eco-Friendly Biocontrol of Moniliasis in Ecuadorian Cocoa Using Biplot Techniques. *Sustainability*, 15, 4223.
- Vargas-Arana, G.; Merino-Zegarra, C.; Tang, M.; Pertino, M.W. & Simirgiotis, M.J. (2022). UHPLC–MS Characterization, and Antioxidant and Nutritional Analysis of Cocoa Waste Flours from the Peruvian Amazon. *Antioxidants*, 11, 595

- Villamil Carvajal, J.E.; Blanco Valbuena, J.O. & Viteri Rosero, S.E. (2012). Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 65, 6305–6315.
- Vriesmann, L.C.; Amboni, R.D.D.M.C. & de Oliveira Petkowicz, C.L. (2011). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Ind. Crops Prod.*, 34, 1173-1181.
- Wawrzyniak, J. (2021). Model of Fungal Development in Stored Barley Ecosystems as a Prognostic Auxiliary Tool for Postharvest Preservation Systems. *Food Bioprocess Technol.*, 14, 298–309.
- Whitney, E. & Rolfes, S. (2008). *Nutrição—Volume I: Entendendo os Nutrientes*, 1st ed.; Cengage Learning: Boston, MA, USA.
- Wolfe, R.; Baum, J.; Starck, C. & Moughan, P. (2018). Factors contributing to the selection of dietary protein food sources. *Clin. Nutr.*, 37, 130–138.
- Xie, S.; Li, H.; Li, N.; Liu, Z.; Xu, D.; Hu, L. & Mo, H. (2023). *Lentinus edodes* Powder Improves the Quality of Wheat Flour Gluten Sticks. *Foods*, 12, 1755.
- Xu, X.F.; Yan, H.D.; Tang, J.; Chen, J. & Zhang, X.W. (2014). Polysaccharides in *Lentinus edodes*: Isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54, 474–487.
- Yahya, M.; Ginting, B. & Saidi, N. (2021). In-Vitro Screenings for Biological and Antioxidant Activities of Water Extract from *Theobroma cacao* L. Pod Husk: Potential Utilization in Foods. *Molecules*, 26, 6915.
- Yan, W.; Hunt, L.A.; Sheng, Q. & Szlavnic, Z. (2000). Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Sci.*, 40, 597–605.
- Yan, W. & Kang, M.S. (2002). *GGE biplot analysis: A graphical tool for breeders, geneticists, and agronomists*. CRC Press.
- Yang, W.J.; Lu, X.J.; Zhang, Y. & Qiao, Y. (2019). Effect of cooking methods on the health-promoting compounds, antioxidant activity and nitrate of tatsoi (*Brassica rapa* L.ssp.narinosa). *J. Food Process. Preserv.*, 43, e14008.
- Younes, A.; Li, M. & Karboune, S. (2022). Cocoa bean shells: A review into the chemical profile, the bioactivity and the biotransformation to enhance

their potential applications in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*

- Yu, Y.R.; Wang, G.U.; Yin, X.Y.; Ge, C.R. & Liao, G.Z. (2021). Effects of different cooking methods on free fatty acid profile, water-soluble compounds and flavor compounds in chinese piao chicken meat. *Food Res. Int.* 2021, 149, 110696.
- Zhou, X.; Guan, Q.; Wang, Y.; Lin, D. & Du, B. (2022). Effect of Different Cooking Methods on Nutrients, Antioxidant Activities and Flavors of Three Varieties of *Lentinus edodes*. *Foods*, 11, 2713.
- Zou, H. & Hastie, T. (2005). Regularization and variable selection via the elastic net. *Journal of the royal statistical society: series B (statistical methodology)*, 67, 301-320.