

Probióticos y prebióticos aplicables en un producto a base de chocolate

Trabajo de grado para optar el título de Especialista en Alimentación y Nutrición

Leidy Natalia Osorio Buitrago

Asesor

**Elly Vanessa Acosta Otalvaro
Magister en Ingeniería Química**

**Corporación Universitaria Lasallista
Facultad de Ingenierías
Especialización en Alimentación y Nutrición
Caldas - Antioquia
2018**

Contenido

Introducción.....	7
Planteamiento del problema.....	8
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Metodología	10
Criterios de búsqueda	11
Resultados	12
Planeación	12
Búsqueda.....	13
Análisis de información	14
Inteligencia	14
Generalidades de los probióticos y los prebióticos	14
Probióticos.....	14
Beneficios funcionales de los Probióticos	16
Probióticos en productos de chocolate	18
Cepas de probióticos viables para la aplicación en chocolate:	20
Prebióticos	21
Tipos de prebióticos viables.....	22
Beneficios funcionales de los Prebióticos	23
Aspectos normativos	24
Condiciones de proceso.....	27
Métodos de evaluación	28
Tendencias en el mercado en productos a base de chocolates adicionados con probióticos y prebióticos.....	29
Conclusiones.....	34
Referencias	36

Listado de Figuras

Figura 1. Metodología vigilancia tecnológica.....	10
---	----

Listado de Tablas

Tabla 1. Brief de vigilancia tecnológica	12
Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda	13
Tabla 3. Caracterización tendencias de productos abase de chocolate con probióticos y/o prebióticos	30

Lista de Apéndices

Apéndice A. Roadmap tecnológico da respuestas al brief

Resumen

Los productos con probióticos y prebióticos se han caracterizado por ser vehiculizados en derivados lácteos; sin embargo existe un interés en nuevas matrices de alimenticias para la aplicación de estos. En los últimos años se han venido realizando aplicaciones de probióticos y prebióticos en el desarrollo de productos de chocolate y se ha encontrado, que es una base adecuada para mantener la viabilidad este tipo de sustancias. El chocolate no solo es un alimento de indulgencia si no que se convierte en un producto con un beneficio para el consumidor por su contenido de polifenoles que son compuestos antioxidantes .

Es fundamental que la industria de alimentos se mantenga a la vanguardia y alcance nuevos avances en términos de salud y nutrición, una tendencia marcada en la actualidad, con el fin de brindar al consumidor propuestas atractivas, con declaraciones nutricionales y manteniendo las características sensoriales y propias del producto.

El propósito de este trabajo se centra en presentar una vigilancia tecnológica para encontrar los probióticos y prebióticos viables de aplicación en coberturas de chocolate, y las posibles declaraciones nutricionales desde los aspectos normativos de Colombia para comunicar en el empaque del producto terminado.

Palabras Clave: Probiótico, prebiótico, chocolate, declaraciones nutricionales, normatividad.

Introducción

El consumidor actual ha ido tomando conciencia de la importancia de los alimentos que contienen sustancias que ayudan a promover la salud y la mejora de su estado nutricional. En la actualidad se han multiplicado las alteraciones que ocasionan malestargastrointestinal como hinchazón, flatulencia, dolor abdominal, entre otros. Al tratarse de un trastorno funcional, se han generado nuevas hipótesis de que dichas alteraciones ocurren por cambios en la microbiota intestinal. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias de alimentación donde se incluyen ingredientes como probióticos y prebióticos, los cuales han sido estudiados en numerosas investigaciones, las cuales muestran su efecto como componentes bioactivos en la reducción de riesgos de algunas enfermedades gástricas. Se ha encontrado que el chocolate puede ser una alternativa adicional para la incorporación de probióticos y prebióticos ya que tiene otras propiedades beneficiosas como su actividad antioxidante, donde los compuestos fenólicos son los responsables de esta, además que pueden jugar un papel importante en el retraso del estrés del probiótico, que es una de las principales causas de muerte de dichos microorganismos, por lo que probablemente permita tener una mayor viabilidad y vida útil de estos en el producto.

A partir de la realización de una vigilancia tecnológica, se pretende encontrar las posibles alternativas de probióticos y prebióticos que puedan ser aplicados en productos a base de chocolate, desde la perspectiva técnica y legal. Con el fin de generar una propuesta de aplicación futura para el Negocio de Chocolates Nutresa, con lo que será posible obtener un portafolio saludable que le permita estar alineado con las tendencias de salud y nutrición del mercado.

Planteamiento del problema

El Negocio de Chocolates Nutresa, tiene dentro de sus retos estratégicos la posibilidad de ofrecer al consumidor productos que favorezcan su salud digestiva. Por esta razón se evaluará a partir de la construcción de una revisión bibliográfica la viabilidad de la aplicación de probióticos y prebióticos en productos a base de chocolate. Es importante encontrar las mejores alternativas referenciadas con fines de una posterior aplicación, lo que representa un reto tecnológico desde el punto de vista de la vida útil del producto y del microorganismo en la matriz de chocolate, ya que deberá garantizarse la cantidad mínima requerida hasta el último día de su vida en anaquel. Adicionalmente, el uso de estos ingredientes no deberá afectar las características sensoriales y reológicas del producto. Será necesario revisar todos los aspectos normativos que requiere dicha aplicación, con el fin de presentar al Negocio de Chocolates Nutresa, una propuesta aplicable.

Objetivos

Objetivo general

Determinar las fuentes de prebióticos y probióticos para su aplicación en un producto a base de chocolate.

Objetivos específicos

- Identificar las tendencias en prebióticos y probióticos que brindan salud digestiva, con viabilidad de aplicación en producto a base de chocolate.
- Seleccionar los prebióticos y probióticos adecuados para su uso en la elaboración de un producto a base de chocolate.
- Verificar las condiciones nutricionales, legales y tecnológicas necesarias, para la aplicación del prebiótico y probiótico con viabilidad de aplicación en un producto a base de chocolate

Metodología

Este trabajo se desarrollará de acuerdo a la metodología propuesta por la norma española UNE 1666006 (AENOR, 2011), la cual plantea un proceso definido para la elaboración de ejercicios de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva. La Figura 1 muestra una ruta sistemática en la que se capta, analiza, se realiza inteligencia y se comunica la información obtenida, con el propósito de identificar y anticipar oportunidades para la generación de futuros proyectos de investigación, el mejoramiento de procesos y el desarrollo de nuevos productos asociados a la temática propuesta.

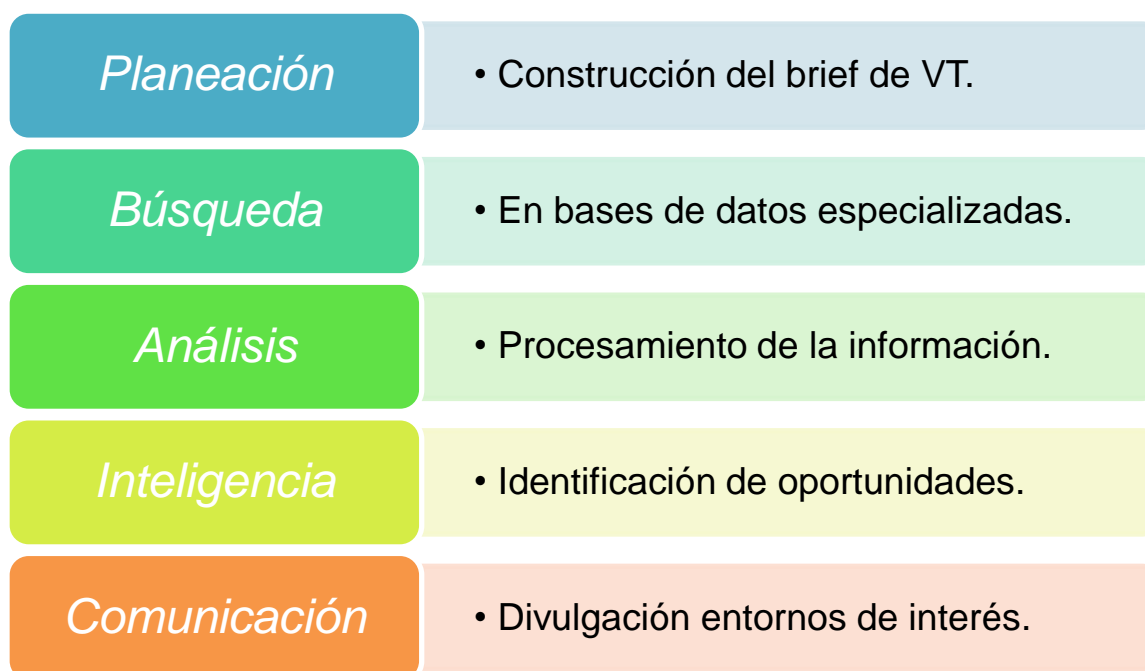


Figura 1. Metodología Vigilancia Tecnológica (AENOR 2011)

Criterios de búsqueda

Durante la etapa de búsqueda, se da respuesta a los objetivos planteados y se organizará la información en tres temas principales: Clases de probióticos y prebióticos, viabilidad de aplicación en productos a base chocolate, y requerimientos legales y nutricionales para el desarrollo.

La información relacionada en el presente informe fue obtenida de las siguientes fuentes:

- Scopus (www.scopus.com).
- Science Direct (www.Sciencedirect.com).
- Wiley Online Library (<http://onlinelibrary.wiley.com/>)
- Mintel GNPD (www.gnpd.com)

Resultados

Planeación

En la Tabla 1 se presenta el brief de vigilancia tecnológica que se construyó para la planeación y búsqueda de la información. Este consta de la consolidación de las preguntas de investigación a resolver con la información obtenida en bases de datos especializadas y artículos científicos. Adicionalmente se delimitó el rango de tiempo y las palabras claves para las ecuaciones de búsqueda (Ver brief en el anexo 1).

Tabla 1. Brief de vigilancia tecnológica (Información propia)

BRIEF DE REQUERIMIENTO DE VIGILANCIA TECNOLÓGICA	
	
A continuación encontrará una serie de preguntas que usted como Cliente de la vigilancia tecnológica debe resolver para solicitar un ejercicio:	
1	TEMA Y OBJETIVO GENERAL
Evaluar la viabilidad de la aplicación de probióticos y prebióticos en coberturas de chocolate	
2	¿CUÁLES PREGUNTAS QUIERE RESOLVER A PARTIR DE LA V.T.?
<p>¿Cuáles son las cepas de probióticos viables para la aplicación en coberturas de chocolate? ¿Cuáles son los mecanismos de elaboración de probióticos y cuáles son sus beneficios tecnológicos? ¿Cuáles son los beneficios funcionales de los probióticos? ¿Cuáles son los beneficios funcionales de los prebióticos? ¿Cuáles son los tipos de prebióticos viables para la aplicación en coberturas de chocolate? ¿Que claims son permitidos por la legislación nacional para realizar declaraciones sobre los beneficios de un probiótico en coberturas de chocolate? ¿Cuál es el perfil nutricional que debe cumplir el producto para declarar beneficios asociados con probióticos? ¿Cuáles son las condiciones de proceso requeridas para garantizar la disponibilidad de los m.o. probióticos durante el tiempo de vida útil de la cobertura? ¿Cuáles son las cantidades mínimas requeridas de m.o. viables en el producto terminado y en que unidades se expresa? ¿Cuáles son las metodologías de validación para este tipo de productos? ¿Qué productos se encuentran en el mercado con estas características (probióticos y prebióticos)? ¿Cuál sería el target para este tipo de productos? ¿Actualmente cuáles son los países que más consumen productos de chocolate con probióticos?</p>	
3	ALCANCE
3.a	Temas específicos para vigilar
Proveedores, evaluación de actividad científica por artículos, evaluación de actividad tecnológica por patentes.	
3.b	Geografía
El mundo	
3.c	Rango de tiempo de la información a buscar
Información disponible a partir de 2010	
4	PALABRAS CLAVE PRELIMINARES (EN INGLÉS Y ESPAÑOL)
Probióticos, prebióticos, chocolate, salud digestiva	

Búsqueda

En la Tabla 2, se presentan las ecuaciones de búsqueda utilizadas en las bases de datos especializadas.

Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda (Elaboración propia)

Ecuaciones de búsqueda para Scopus y Sciencedirect
1. (probiotics) OR (aliment) (TITLE (probiotics) AND TITLE (aliment)), TITLE-ABS-KEY ((probiotics*) AND (aliment))
2. (TITLE-ABS-KEY (probiotics) AND TITLE-ABS-KEY (chocolate*))
3. TITLE-ABS-KEY ((probiotics) AND (chocolate*)) AND DOCTYPE (re)
4. TITLE-ABS-KEY (((probiotics*) AND (aliment)))
5. TITLE-ABS-KEY (((probiotics) AND (chocolate*)))
6. TITLE-ABS-KEY (((prebiotics) AND (chocolate*)))

Se consultaron las siguientes bases de datos para la obtención de artículos científicos.



Análisis de información

En el Anexo 1, se presenta la información obtenida y closterizada dando respuesta a las preguntas presentadas en el brief mediante un roadmap tecnológico.

Inteligencia

Generalidades de los probióticos y los prebióticos

Probióticos

Los probióticos son un conjunto de microorganismos viables en cantidad suficiente para aumentar la microflora intestinal manteniendo un equilibrio y produciendo efectos beneficiosos a la salud del consumidor y por lo tanto manteniendo un bienestar (Fooks & Gibson, 2002). Estos pueden actuar sobre los microorganismos patógenos y ayudan a generar un balance microbiano en el tracto gastrointestinal desempeñando un papel importante en la nutrición y la salud (Rastall, Fuller, Gaskins, & Gibson, 2000; Gupta & Garg, 2009).

Según Del Coco, (2015), la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Pre-bióticos definió mediante un estudio con expertos que los microorganismos viables para consumo humano se podían clasificar, en los microorganismos no probióticos que son aquellos que se encuentran naturalmente en un proceso de fermentación en cualquier alimento en una cantidad de 1×10^6 (UFC) por porción de dicho alimento y su beneficio no ha sido comprobado por algún estudio científico. Además de los microorganismos probióticos que están divididos en tres categorías: la primera corresponde a los que se encuentran en alimentos sin tener una función específica

pero que son seguros para ser suministrados y el segundo grupo son los probióticos que cuentan con un efecto específico para la salud y está comprobado científicamente. En el tercer grupo, se encuentran los que se utilizan con fines medicinales o agentes bioterapéuticos y deben tener un efecto específico indicado para el tratamiento o prevención de enfermedades. Estos últimos están regulados (Hill et al., 2014).

Los probióticos incluyen una amplia gama de microorganismos, principalmente bacterias ácido lácticas (BAL), también pueden ser levaduras ya que logran permanecer vivas en condiciones anaerobias como el intestino (Anal & Singh, 2007). En la producción de probióticos se han utilizado diferentes especies de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* y *salivarius*), *Streptococcus*, *Bifidobacterium* (*adolescentes*, *animalis*, *bifidum*, *breve* y *longum*) y *Lactococcus* (Coco et al., 2015).

La selección de los microorganismos probióticos depende de una serie de aspectos funcionales y tecnológicos, con el fin de tener un efecto positivo en el tracto intestinal (Pyar, Liong & Peh, 2013). En primer lugar, los probióticos necesitan resistir el proceso de fabricación y almacenamiento, para ser viables en el producto comercial al final de la vida útil, deben estar por encima de un 10^6 UFC/g (Possemiers, Marzotari, Verstraete & Van de Wiele, 2010). En segundo lugar, los microorganismos probióticos deben ser resistentes a las condiciones fisicoquímicas en el sistema gastrointestinal, como el ácido gástrico, las secreciones biliares y la competencia con la microflora del organismo (Fooks et al., 2002).

Beneficios funcionales de los Probióticos

La ingestión de probióticos puede recomendarse como un enfoque preventivo para mantener el "bienestar" (Fooks et al., 2002). En teoría, el aumento de los niveles de probióticos puede inducir una "barrera" contra los microorganismos patógenos comunes, además, pueden ayudar a las condiciones inflamatorias y los trastornos intestinales agudos y crónicos (Possemiers et al.,2010). Otro autor Fooks et al.,(2002)plantea que algunos de los beneficios funcionales de los probióticos son la reducción del dolor abdominal por inflamación y gases y el incremento de la biodisponibilidad de nutrientes como proteínas y minerales.

Según Hill et al.,(2014) el panel de expertos de “La Asociación Científica Internacional de Probióticos y Pre-bióticos”, reconocieron ciertos efectos que se pueden atribuir a los probióticos de varias especies para uso en alimentos. El panel, además consideró dos beneficios generales comunes de los probióticos, como mantener un tracto digestivo y un sistema inmune saludable. La asociación también concluyó que uno de los beneficios centrales de los probióticos es ayudar a la flora intestinal basados en los estudios donde hay evidencia que diferentes cepas de probióticos. Los expertos de la asociación informaron que en investigaciones disponibles también se encontró que los probióticos apoyan el sistema inmunológico, nervioso y endocrino y ayudan a la prevención de enfermedades alérgicas y a la salud del tracto reproductivo, la cavidad oral, los pulmones y la piel. También se encuentran identificadas la producción de ácidos grasos de cadena corta, el aumento en el recambio de enterocitos y la competencia en el intestino con microorganismos patógenos. También han demostrado limitar la infección por distintos agentes infecciosos tales como: rotavirus, norovirus,

Escherichia coli, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile* y parásitos como: *Cryptosporidium* *toxocara canis*, entre otros. El panel también concluye que la evidencia aún no se ha relacionado con muchas cepas de probióticos solo se ha dado para unas especies específicas. Esta teoría es apoyada por Domingo et al., (2017) donde explica que el equilibrio nutricional y microbiológico del sistema gastrointestinal se obtiene con el consumo de probióticos, donde sus efectos se obtienen y varían de acuerdo a la cepa.

Los probióticos deben cumplir con algunas características para poder considerarlos viables y poder obtener sus beneficios: deben ser consumidos vivos, deben sobrevivir al tránsito gastrointestinal (ácido del estómago, biliar y pancreático), esto depende del género, la especie, la cepa, dosis ingerida, capacidad de colonizar, interacción con las células epiteliales intestinales y capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, promoviendo así la exclusión competitiva de patógenos y la inmunomodulación (Domingo et al., 2017).

En la revisión realizada por Domingo et al.,(2017) se encuentran diferentes estudios que corroboran el beneficio de algunos probióticos frente a enfermedades comunes del sistema gastrointestinal: gastroenteritis aguda (viral), la diarrea asociada a antibióticos, la diarrea de los viajeros, la reservoritis y el síndrome del intestino irritable (SII), gastritis crónica debida a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Este mismo autor recopiló información de la base datos de Cochrane donde se analizaron 63 estudios que demostraron que los probióticos *Lactobacillus GG* y *S. boulardii* reducen el riesgo general de la diarrea en un 59%.

Probióticos en productos de chocolate

Durante la última década, más de 500 nuevos productos con estos compuestos se han introducido en el mercado y la industria busca dar a los consumidores alimentos funcionales para responder a las necesidades de salud y bienestar con alimentos que ayuden a reducir o prevenir algunas enfermedades (Da Silveria et al., 2015).

Dentro de los alimentos funcionales se encuentran aquellos que contienen probióticos y prebióticos los cuales son comunes en matrices lácteas, algunos estudios se han realizaron en diferentes matrices de alimentos, como la leche fermentada, queso minas frescal, queso prato y helado de leche de oveja con probióticos y prebióticos (Konar et al., 2018). También estas aplicaciones se han venido realizando en productos de confitería como el caso de las golosinas de chocolate o coberturas de chocolate teniendo un alto reconocimiento comercial (Konar et al., 2018). El chocolate es un producto con un amplio consumo y conocido mundialmente por consumidores de todas las edades, por sus propiedades sensoriales y buena percepción por el consumidor (Erdem et al., 2013; Toker et al., 2017). Los principales chocolates que se encuentran en el mercado son blanco, leche y amargo (Konar et al., 2018).

Vandeplas, Geert & Georges, (2015), mencionan que los probióticos requieren una matriz optima que garantice su supervivencia, el chocolate recientemente se ha encontrado como una matriz adecuada para las cepas probióticas. Possemiers et al.,(2010) afirmaron que el chocolate asegura la supervivencia probiótica cuatro veces más que los productos que contienen leche. Los resultados de estudios previos han demostrado que la introducción de cepas probióticas encapsuladas en el chocolate puede ser un excelente medio para protegerlos del estrés que puede ser ocasionado

por el pH gástrico, las sales biliares del estómago y las condiciones extremas de proceso en la elaboración del chocolate (Toker et al., 2017).

Además, los probióticos en el chocolate tienen una vida útil mayor que los productos probióticos tradicionales, además de una mayor resistencia en el tránsito por el estómago, permitiendouna colonización más efectiva en el tracto intestinal debido al alto contenido de grasa (Toker et al., 2017).

Los autores Petronijevic´, Rajlic´, Lazic´, Pezo & Nedovic´, (2017); Perea, Cadena & Herrera, (2009) establecen que nutricionalmente en el chocolate se pueden resaltar compuestos polifenolicos tales como: Las catequinas (epicatequina, epigalocatequina, galocatequina y catequina) y flavonoides como las procianidinas, antocianinas, flavononas y flavonol glicosídicos, los cuales tienen propiedades antioxidantes; pero durante el procesamiento del chocolate se puede dar la pérdida de la gran mayoría de estos compuestos. En el estudio realizado por Perea et al.,(2009), se encontró que hay pérdida de estas sustancias, pero en el caso del Chocolate amargo se logra encontrar polifenoles presentes en el producto terminado.

Según Petronijevic et al.,(2017), establece que incorporar microorganismos probióticos vivos en los alimentos y lograr que estos sean viables durante toda la vida útil del producto es complejo, debido a la influencia de varios factores, como la temperatura, oxígeno, actividad del agua, presión osmótica, mecánica estrés, valor de pH.

Los proveedores de probióticos se están apoyando en nuevas tecnologías como la microencapsulación, que es una técnica que recubre con una pared el micoorganismo para protegerlo durante la vida útil del producto y durante el paso por el

tracto gastrointestinal y así pueda llegar viable al sitio de acción (colon) y pueda activarse para poder cumplir con sus funciones de probiótico (Petronijevic et al., 2017).

Cepas de probióticos viables para la aplicación en chocolate:

En algunos estudios se ha utilizado microorganismos probióticos en productos de chocolate, tales como: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* y *Bacillus indicus*, sin embargo los más comunes son: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Konar, Toker, Sirin, Sagdic, 2016).

En otras aplicaciones Konar et al., (2018) utilizó el probiótico *Lactobacillus acidophilus* en chocolate blanco y encontraron resultados satisfactorios en cuanto a la viabilidad del microorganismos a los 90 días, alcanzando un contenido de 10×6 UFC/g.

En el estudio realizado por Toker et al., (2017) aplicaron las bacterias probióticas *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus acidophilus*. En otra investigación el autor Petronijevic' et al., (2017) realizó un estudio con el objetivo de aplicar en diferentes tipos de chocolate (leche, semisweet y oscuro) tres cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LH5, *B. breve* BR2 y *S. thermophilus* ST3), microencapsulados con recubrimiento doble, posteriormente determinaron su viabilidad en un tiempo de vida útil de 360 días a 4 °C y 20 °C.

En la revisión realizada por Konar et al., (2018), se realizó una recopilación de los microorganismos probióticos más utilizados en diferentes matrices de Chocolate, esta selección fue tomada de varios artículos de investigación donde fueron aplicados y evaluada su funcionalidad. En los productos de Chocolate amargo se encontró que se

han aplicado los probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus indicus*, *Bacillus lactis* y *Bacillus longum*, en los chocolates con leche *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* subsp. *Lactobacillus coagulans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus lactis* y *Bacillus longum*, en cobertura de chocolate para recubrir cereales para el desayuno *Lactobacillus rhamnosus*, en Chocolate blanco *Lactobacillus helveticus* y *Bacillus longum*, en mousse de Chocolate *Lactobacillus paracasei* subsp y *Lactobacillus paracasei*.

La aplicación de estos microorganismos según Konar et al.,(2018), se realizó en diferentes formas, liofilizados (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus lactis*, *Lactobacillus brevis* subsp, *Lactobacillus coagulans*, y *Bacillus indicus*), microencapsulados (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* y *Bacillus longum*), cuyos estudios se realizaron a diferentes dosis de inoculación y temperaturas.

Prebióticos

Los prebióticos son carbohidratos dietarios, fermentables no digeribles y son metabolizados selectivamente por los probióticos, produciendo en estos la estimulación del crecimiento y la actividad de un grupo selectivo de bacterias en el colon ocasionando un efecto beneficioso sobre la salud del individuo (Fooks et al., 2002).

Los prebióticos han atraído el interés de las investigaciones y la industria alimentaria, debido a sus beneficios nutricionales y a la mejora de las propiedades sensoriales del producto (Fooks et al., 2002).

Entre los prebióticos más estudiados y comercialmente usados en productos de chocolatería se encuentran: inulina, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y la polidextrosa. (Davis, Martinez, Jens & Hutkins, 2010).

Los claims más comunes utilizados en los productos con este tipo de ingredientes son: enriquecido en fibra, prebiótico y bajo en calorías (Resolución 333 de 2011).

Tipos de prebióticos viables

Dentro de las principales características de los productos que busca el consumidor tener y la industria desarrollar, se encuentran los productos con compuestos prebióticos y con bajo contenido calórico y en alimentos como el chocolate el propósito es reducir o sustituir el contenido de azúcar mientras se mantienen las características sensoriales (Konar et al., 2013).

Unos de los prebióticos más importantes utilizados en las formulaciones de alimentos son los fructooligosacáridos (FOS). Contienen principalmente las moléculas de cadena corta mejoran el sabor y la dulzura y se utilizan para sustituir parcialmente la sacarosa en diferentes matrices de alimentos (Aidoo, Afaokwa, & Dewettinck, 2015; Konar et al., 2016). A pesar de su dulzura moderada pueden ser utilizados como un sustitutos de azúcar, y tienen ventajas tecnológicas y propiedades como el aumento de la viscosidad, lo que lleva a una textura y una sensación mejor en la boca (Corradini, Lantano & Cavazza, 2013).

La inulina se define como una sustancia prebiótica, es una materia prima que puede usarse como agente de cuerpo en la matriz de chocolate y tiene resultados

positivos (Konar et al., 2016). Es un ingrediente que en sus aplicaciones permite responder a este tipo de demandas de los consumidores, ya que es una fibra dietética que pasa a través del tracto digestivo sin ser en gran medida digerida (Konar et al., 2016).

La polidextrosa es un polisacárido que se utiliza como ingrediente en alimentos, tiene unas características funcionales deseables debido a sus propiedades prebióticas, es un polvo no digerible, inodoro, con un bajo contenido calórico de 1 kcal/g, comportándose como una fibra no dietaria. Este compuesto se conforma principalmente de glucosa con algunas moléculas de sorbitol y ácido cítrico y su poder edulcorante es del 10% lo que permite reemplazar en gran parte la sacarosa (Konar et al., 2018; Konar, Özhan, Artik, & Poyrazoglu, 2014)

Existe una gran oportunidad en el uso de la polidextrosa y la inulina en productos de chocolatería ya que por su composición se pueden favorecer la reducción en azúcar y grasa, obteniendo un bajo contenido calórico y aprovechando su efecto prebiótico en el producto final (Konar et al., 2018).

Beneficios funcionales de los Prebióticos

Erdemaet et al., (2013), establece que las fibras dietéticas son carbohidratos no digeribles en el intestino delgado que tienen beneficios de salud como, reducir la ingesta de calorías, acortar el tiempo del tránsito intestinal, aumento del volumen fecal, retraso del vaciamiento gástrico, ayudando a reducir el riesgo de cáncer y enfermedades del corazón, disminuye la absorción de la glucosa, mejorando las funciones inmunes y disminuyendo niveles de colesterol sérico.

En la revisión realizada por Konar et al.,(2018), la adición de fibras prebióticas como la inulina, la polidextrosa los GOS y FOS, actúan como protectores probióticos y podrían utilizarse en productos de chocolate.Los fructooligosacáridos favorecen el crecimiento de las bifidobacterias y lactobacillus presentes en el intestino, estimulan la actuación de las defensas naturales del cuerpo humano, estimulan el transito intestinal ydisminuyen la posibilidad de aparición de transtornos digestivos.

Los autores Calvo, Gómez, Royol & López, (2011), describen que los beneficios de los probioticos como la inulina, los FOS y GOS, mantienen la función intestinal en un estado normal, además de la mucosa del colon, brindando resistencia a los microorganismos patogenos que puedan colonizar en el tracto gastro intestinal.

Aspectos normativos

En la realización de declaraciones nutricionales y de salud en un alimento que contenga probióticos y prebióticos, se debe tener en cuenta la normatividad, en el caso de Colombia se encuentra en vigencia la resolución 333 de 2011 “Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano”, donde se encuentra las declaraciones permitidas para no generar engaño al consumidor.

En dicha resolución se encuentran los siguientes modelos de declaraciones que se pueden realizar en el material de empaque de un producto terminado, adicionado con probióticos y prebióticos: "Una adecuada alimentación y un consumo regular de alimentos con microorganismos probióticos, puede ayudar a normalizar las funciones digestivas y regenerar la flora intestinal". “Una adecuada alimentación y un consumo

regular de alimentos con microorganismos probióticos, puede ayudar a normalizar las funciones digestivas y regenerar la flora intestinal”. “Una dieta adecuada y el consumo regular de mínimo X g al día de prebióticos Y, promueve una flora intestinal saludable/buena/balanceada”; “Beneficia la flora intestinal”; “Ayuda en el mejoramiento intestinal /función digestiva”.

Adicional a estas declaraciones, se debe dar claridad al consumidor que el consumo adecuado y regular de microorganismos probióticos no es el único factor para mejorar su salud.

Según la resolución 333 de (2011) para dar cumplimiento a las declaraciones anteriores mencionadas el alimento debe contener un número mayor o igual de bacterias viables de origen probiótico a 1×10^6 UFC/g en el producto terminado hasta el final de la vida útil.

La expresión de las declaraciones de propiedades de salud debe hacerse en términos condicionales, utilizando palabras como: “puede”; “podría”; “ayuda”; “contribuye a”.

La normatividad Colombiana también hace la claridad que las declaraciones deben basarse en una evidencia científica y el nivel de la prueba debe ser suficiente para establecer el tipo de efecto que se declara y su relación con la salud, adicionalmente debe estar soportada en datos científicos aceptables.

Declaraciones que relacionan el consumo de probióticos con una mejor función digestiva:

El microorganismo o bacteria debe cumplir lo siguiente: Estar vivo, no ser patógeno y su medio natural es el tracto digestivo humano. Ser capaz de sobrevivir en

el tracto intestinal, es decir, ser resistente a los jugos gástricos y los ácidos biliares. Tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal. Tener la capacidad de colonizar el intestino. Tener la capacidad de sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto al cual se adiciona. La declaración debe indicar que el consumo adecuado y regular demicroorganismos probióticos no es el único factor para mejorar las funciones digestivas y que existen otros factores adicionales a considerar como el ejercicio físico y el tipo de dieta (Resolución 333 de 2011).

De igual manera que las declaraciones de propiedades de salud que debe cumplir el material de empaque del producto terminado, la sustancia considerada como prebiótico debe cumplir lo siguiente: La cantidad de alimento que debe consumirse, para obtener el efecto benéfico debe ser razonable en el contexto de la dieta diaria. Ser una sustancia preferida por una o más especies de bacterias benéficas en el intestino grueso o colon. Ser resistente a los ácidos gástricos (a la acidez gástrica). Ser fermentables por la microflora intestinal. Ser resistente a la hidrólisis enzimática endógena. Tener la capacidad de producir cambios en el lumen del intestino grueso o en el organismo del huésped que muestra beneficios para la salud. Estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de aquellas bacterias que están asociadas con la salud y el bienestar. (Resolución 333 de 2011).

En la regulación resolución 333 de (2011), también se encuentran prohibiciones en las declaraciones de salud de los beneficios de los probióticos, donde no se deben implicar en ningún caso propiedades curativas, medicinales ni terapéuticas y por tanto, las afirmaciones en éstas contenidas sobre el consumo de alimentos o, la inclusión de determinados componentes de los alimentos en la dieta, solamente se permiten cuando

éstas hacen referencia a su contribución o ayuda en la reducción del riesgo de contraer una enfermedad.

El producto terminado debe cumplir con un perfil nutricional, donde debe contener por porción declarada en la etiqueta, los nutrientes como grasa total, grasa saturada, colesterol y sodio en cantidades inferiores a las siguientes: Grasa total 13g, grasa saturada 5g, colesterol 60mg y sodio 480mg.

Condiciones de proceso

Para obtener un chocolate de buena calidad, se deben tener en cuenta diferentes variables del proceso, como las variedades de cacao, los ingredientes agregados, los métodos usados en las diversas etapas del procesamiento en la postcosecha y en la fabricación de chocolate, ya que todos estos tienen un efecto en el producto terminado y en sus características sensoriales (Gutierrez et al., 2017).

Después de recibidas las semillas de cacao secas con una humedad entre 6 y 7% se realiza una inspección de los granos para garantizar una adecuada fermentación, posteriormente se realiza una limpieza para retirar residuos como madera, tierra y metales por medio de imanes y otros procesos físicos; luego, los granos son llevados al proceso de tostión donde la función principal de esta etapa es desarrollar el aroma del cacao y disminuir la carga microbiana del grano. Otra de las funciones del proceso de tostión donde se da la separación de la cáscara y la corteza por densidad y ayuda a la reducción de microorganismos provenientes de la semilla de cacao crudo. En La etapa siguiente se da el prensado, por compresión se separa la manteca de cacao y el licor de cacao. Posteriormente se realiza un mezclado de estos

ingredientes con el resto de materias primas de la formulación según el tipo de producto de chocolate. Esta mezcla es pasada por un pre-refinador y un refinador con el fin de reducir su tamaño de partícula hasta 18-22 μ m, para minimizar la percepción de sólidos en el producto final. La masa resultante es llevada a un proceso de conchado el cual se realiza a una temperatura aproximada de 50 °C y se le entrega trabajo mecánico con el fin de lograr la reología necesaria para el chocolate, además en esta etapa se desarrolla gran parte del aroma, el sabor, se evapora la humedad, se eliminan los ácidos volátiles y se estabiliza la viscosidad, posteriormente el producto es atemperado, moldeado y empacado (Gutierrez et al. 2017).

Para la aplicación del probiótico en el chocolate, se requiere de un probiótico cuya presentación comercial permita ser aplicado directamente sobre los tanques removedores previos al atemperado, esto con el fin de evitar contaminación cruzada en posteriores procesos, y a su vez evitar el estrés del microorganismo.

El microorganismo debe ser vehiculizado en un medio que tenga afinidad con la matriz de chocolate y no debe requerir una preparación previa que incluya solubilidad en agua ya que esto afecta la calidad de la cobertura (Fooks et al., 2002; Possemiers et al., 2010).

Métodos de evaluación

Los productos de chocolate con la incorporación de probióticos y prebióticos deben ser evaluados con las siguientes metodologías con el fin de establecer la viabilidad de los microorganismos en el tiempo de vida útil de producto y los cambios presentados en los aspectos sensoriales y fisicoquímicos del alimento: actividad

acuosa (aw), pH, humedad, análisis bromatológico, recuento de unidades formadoras de colonia del microorganismo probiótico, recuento de microorganismos indicadores (mohos, levaduras y mesófilos) y análisis sensorial.

Tendencias en el mercado en productos a base de chocolates adicionados con probióticos y prebióticos

De acuerdo con Mintel, (2017), en el mercado de los productos de chocolate con probióticos y prebióticos predominan las tabletas amargas y semi amargas bajo las marcas Active D'Lites y Attune Foods, todas distribuidas en Estados Unidos y Australia. La empresa The Happy Sol Food Company comercializa unos snacks con piezas de chocolate adicionados con probióticos. En el campo de las barras cubiertas con chocolate la empresa Forte Powerfoods de Estados Unidos ha lanzado productos bajo la marca Truth. Adicionalmente hay productos con chocolate adicionado con probióticos y prebióticos lanzados en China, Polonia y Reino Unido. El target de los productos con chocolate que contienen probióticos y prebióticos son personas adultas que buscan otros beneficios y claims como fibra añadida, kosher, bajo en/sin azúcar, bajo índice glicémico, funcional, digestivo, envase respetuoso con el medio ambiente, porcionabilidad, prebiótico, funcional - adelgazante, sin gluten, bajo en/sin grasas trans, sin agentes alérgicos,vegano, sin ingredientes de origen animal, entre otros.Adicionalmente estos consumidores aprecian los beneficios adicionales del chocolate como los polifenoles.

Tabla 3. Caracterización tendencias de productos abase de chocolate con probióticos y/o prebióticos (MINTEL 2017).



Imagen del producto	Nombre	Probiótico /prebiótico que contiene	Tamaño	Tipo de chocolate	Target	País	Fabricante	Fecha de lanzamiento
	Raw Cacao Paleo Chocolate Mix	probiótico (<i>Bifidobacteriumlactobacillusacidophilus</i>) y prebiótico (inulina)	230 g	Amargo, snak	Adultos/Personas que aprecian los claims: Sin aditivos/Conservantes, Todo Natural, Bajo en/Sin Azúcar, Sin Gluten, Bajo en/Sin Agentes Alérgicos, Ético - Humano, Vegan, Facilidad de Uso, Sin Ingredientes Animales, Prebiotico, Libre de OMG, Medios sociales (Facebook, Twitter e Instagram)	Australia	The Happy Sol Food Company	mar-16
	Active D'Lites with Probiotics Mint Chocolate	Contiene: Fructo- ligosaccharides, y cultivos probióticos (<i>Bifidobacteriumlactis</i> HN019, <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM, <i>Lactobacillus paracasei</i> LPC-37, <i>Bifidobacteriumlactis</i> Bi-07, <i>Bifidobacteriumlactis</i> BL-04)	188.53 g	Barra de chocolate semisweet endulzado con estevia con relleno líquido	Adultos/ Personas que aprecien los claims: Fibra Añadida, Funcional, Kosher, Bajo en/Sin Azúcar, Bajo Índice Glicémico, Funcional - Digestivo, Ético - Envase Respetuoso con el Medio Ambiente, Porcionabilidad, Prebiotico, Funcional - Adelgazante, Medios sociales	Estados Unidos	Wasatch Branding Concepts	jun-14





Imagen del producto	Nombre	Probiótico /prebiótico que contiene	Tamaño	Tipo de chocolate	Target	País	Fabricante	Fecha de lanzamiento
	Active D'Lites with Probiotics Caramel Chocolate	Contiene: Fructooligosaccharides, y cultivos probióticos (<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019, <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM, <i>Lactobacillus paracasei</i> LPC-37, <i>Bifidobacterium lactis</i> Bi-07, <i>Bifidobacterium lactis</i> BL-04)	210.36 g	Barra de chocolate semisweet endulzado con estevia con relleno líquido	Adultos/ Personas que aprecien los claims: Fibra Añadida, Kosher, Bajo en/Sin Azúcar, Bajo Índice Glicémico, Funcional - Digestivo, Ético - Envase Respetuoso con el Medio Ambiente, Prebiótico, Medios sociales	Estados Unidos	Active D'Lites	jun-14
	Active D'Lites with Probiotics Almond Chocolate	Contiene: Fructooligosaccharides y cultivos probióticos (<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019, <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM, <i>Lactobacillus paracasei</i> LPC-37, <i>Bifidobacterium lactis</i> Bi-07.	188.53 g	Barra de chocolate semisweet endulzado con estevia con trozos de almendra	Adultos/ Personas que aprecien los claims: Prebiótico, Fibra Añadida, Funcional, Ético - Envase Respetuoso con el Medio Ambiente, Funcional - Adelgazante, Kosher, Bajo Índice Glicémico, Medios sociales, Bajo en/Sin Azúcar, Porcionabilidad, Funcional - Digestivo.	Estados Unidos	Active D'Lites	jun-14

Imagen del producto	Nombre	Probiótico /prebiótico que contiene	Tamaño	Tipo de chocolate	Target	País	Fabricante	Fecha de lanzamiento
	YakeYouMiao Chocolate Filled Milk Candy	Prebióticos Isomalt y oligosaccharide	80g	Caramelos de leche rellenos con chocolate (para snakear)	Adultos y niños/ Personas que aprecien los claims: Funcional - Belleza, Prebiótico, Funcional, Fortalecido con Vitaminas/Minerales, Funcional - Digestivo	China	Fujian YakeFood Co.	Feb 2011
	Attune Probiotic Coffee Bean Dark Chocolate Bar	probiotic cultures (<i>Bifidobacterium/actis</i> HN019, <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM, <i>Lactobacillus casei</i> LC-11)	19.85 g	Barra de chocolate semiamar go con trozos de café	Adultos./ Personas que aprecien los claims: Todo Natural, Bajo en/Sin Agentes Alérgicos, Vegan, Kosher, Funcional - Sistema Inmunológico, Sin Gluten, Sin Ingredientes Animales, Funcional - Digestivo	Estados Unidos	Attune Foods	Jun 2010
	Chocolate Granola with Chocolate Pieces	Contiene Inulina	50g	Cereales Para el Desayuno	Adultos. / Personas que aprecien los claims: Funcional, Antioxidante, Funcional - Huesos, Bajo en/Sin Agentes Alérgicos, Prebiótico.	Polonia	Sante	mar-17
	Chocolate Dipped Coconut Probiotic & Probiotic Bar	<i>Bacillus coagulans</i> (<i>Lactobacillus sporogenes</i>) inulin	50 g	Barras	Adultos /Personas que aprecien los claims: Bajo en/Sin Colesterol, Fibra Añadida, Kosher, Bajo en/Sin Sodio, Sin Gluten, Bajo en/Sin Grasas Trans, Bajo en/Sin Agentes Alérgicos, Vegan, Sin Ingredientes Animales, Prebiótico.	Estados Unidos	Forte Powerfoods	mar-16

Imagen del producto	Nombre	Probiótico /prebiótico que contiene	Tamaño	Tipo de chocolate	Target	País	Fabricante	Fecha de lanzamiento
	Chocolate Almond Crunch Bar with Prebiotic + Probiotic	<i>Bacillus coagulans</i> (<i>Lactobacillus sporogenes</i>) inulin	50 g	Barras	Adultos / Personas que aprecien los claims: Bajo en/Sin Colesterol, Fibra Añadida, Kosher, Bajo en/Sin Sodio, Sin Gluten, Bajo en/Sin Grasas Trans, Bajo en/Sin Agentes Alérgicos, Vegan, Sin Ingredientes Animales, Prebiótico.	Estados Unidos	Forte Powerfoods	mar-16
	Chocolate & Fudge Cereal Bars	Fructo-oligosaccharides	21g	Barras	Adultos. /Personas que aprecien los claims: Bajo en/Sin Calorías, Vegetariano, Funcional - Digestivo, Prebiótico.	Reino Unido	Weetabix	jun-08

Conclusiones

En la actualidad se presenta la creciente demanda de alimentos funcionales con probióticos y prebióticos, donde los probióticos identificados con características adecuadas para el uso en productos a base de chocolate son los microencapsulados y dentro los prebióticos se encuentran la inulina y la povidextrona.

En el trabajo realizado se identificaron las cepas de microorganismos viables para la aplicación en productos a base de chocolate como los *Lactobacillus* y *Bacillus* en un estado liofilizado y microencapsulado, donde se puede concluir y recomendar que son adecuados para productos a base de chocolate para garantizar su viabilidad durante el paso por el sistema gastrointestinal y así el probiótico poder cumplir su función en el intestino, el cual se da cuando se encuentre en las condiciones adecuadas de disponibilidad de nutrientes, temperatura y humedad.

La normatividad Colombiana permite y brinda un modelo de declaración nutricional y de salud que ayuda a que el consumidor pueda identificar en el chocolate con probióticos el compuesto que lo hace diferente a un chocolate tradicional.

Finalmente, es de resaltar que el chocolate es adecuado para contener prebióticos y probióticos; pero es importante que se sigan realizando más investigaciones de este tipo de aplicaciones, donde se demuestre la biodisponibilidad de estos compuestos.

Se logro identificar en el mercado de diferentes paises que existen productos a base de chocolate con probióticos y prebióticos en diferentes formas y presentaciones, esta tendencia ha aumentado en los últimos años porque el consumidor viene tomando conciencia de consumir alimentos con propiedades saludables.

Referencias

[AENOR] Asociación Española de Normalización y Certificación (2011). Gestión de la I+D+i: Sistema de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva.

Aidoo, Roller Phillip., Afaokwa, Emmanuel Ohene & Dewettinck, Koen. (2015). Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (1), 592-597.

Anal, Anil Kumar & Singh Harjinder. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18 (5), 240-251.

Calvo Bruzos, Socorro Coral., Gómez Candela, Carmen., Royo Bordonada, Miguel Ángel & López Nomdedeu, Consuelo. (2012). *Nutrición salud y alimentos funcionales*, Madrid: UNED. Universidad Nacional de educación a distancia.

Corradini, Claudio., Lantano, Claudia & Cavazza, Antonella. (2013). Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (13), 4591- 4605. Recuperado de <https://link-springer-com.ezproxy.unal.edu.co/article/10.1007%2Fs00216-013-6731-6>

Da Silveria, Ericka O.D., et al. (2015). The effects of inulin combined with oligofructo se and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (1), 445- 451.

Davis, Lauren M. G., Martinez, Inés., Jens, Walter.,& Hutkins, Robert W. (2010). A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (2), 285-292.

Del Coco, valeria F. (2015). Los microorganismos desde una perspectiva de los beneficios para la salud. *Argentina de Microbiología*, 47 (3), 171-173.

Domingo, Juan Jose Sebastian. (2017). Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults. *Gastroenterología y Hepatología*, 40 (6), 417-419.

Erdem, Özlem., et al. (2013). Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber:

Optimization by response surface methodology. *LWT- Food Science and Technology*, 56 (1), 187-193.

Fooks, Laura J & Gibson, Glenn R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 (1), N° 39-49.

Gupta, V & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27 (3), 202-209. Recuperado de <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2009;volume=27;issue=3;spage=202;epage=209;aulast=Gupta>

Gutierrez, Tomy J. (2017). State of the Art Chocolate Manufacture: A Review. *Comprehensive Reviews in food science and food safety*. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12301>

Hill, Collin., et al. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514. Recuperado de <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>

Konar, Nevzat. (2013). Influence of conching temperature and some bulk sweeteners on physical and rheological properties of prebiotic milk chocolate containing inulin. *Eur Food Res Technol*, 236 (1), 135-143.

Konar, Nevzat., Özhan, Bilge., Artik, Nevzat & Poyrazoglu, Ender S. (2014). Usig polidextrose as a prebiotic substance in milk chocolate: effects of process parameters on physical and rheological properties. *Cyta Journal of food*, 12 (2), 150-159. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2013.807437>

Konar, Nevzat., et al. (2018). Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: Effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of Fuctional Foods*, 43, 206-2013.

Konar, Nevzat., Toker, Omer Said., Sirin, Oba & Sagdic, Osman. (2016). Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 35–44.

Ministerio de Protección Social. (2011). Establece el regalmento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que debe cumplir los alimentos envasados para consumo humano. Colombia. (Resolución 333).

Mintel (2017) Chocolatewith claims (Digestive, Probiotic, Prebiotic). Recuperado de <http://www.mintel.com>.

Perea, Janeth Aidé., Cadena, Tatiana., Herrera, Jenny. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud (UIS) Universidad Industrial de Santander*, 41 (2), 128-134. Recuperado de <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/319>

Petronijević, Jovanka Lalčić., Raljić, Jovanka Popov., Lazić, Vera., Pezo, Lato & Nedović, Viktor. (2017). Synergistic effect of three encapsulated strains of probiotic bacteria on quality parameters of chocolates with different composition. *Journal of Functional Foods*, 38, 329-337.

Possemiers, Sam., Marzotari, Massimo., Verstraete, Willy Henry & Van de Wiele, Tom Richard. (2010). Bacteria and Chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food microbiology*, 141 (1-2), 97-103.

Pyar, Hassan., Liong, Min-Tze & Peh, K.K. (2013). Recent Advances in Probiotics and Biomedical Applications. *Journal of Medical Sciences*, 13 (8), 601-614. Recuperado de <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=jms.2013.601.614>

Rastall, R. A., Fuller, R., Gaskins, H. R., & Gibson, G. R. (2000). Colonic functional foods. In G. R. Gibson, & C. M. Williams (Eds.), *Functional foods, concept to product*. Cambridge, England: CRC Press Woodhead Publishing Limited. (p. 375).

Toker, Omer Said., et al. (2017). Stability of lactic acid bacteria in synbiotic sugared and sugar-free milk chocolates. *International Journal of Food Properties*, 20 (sup 2), 1354-1365. Recuperado de <https://www-tandfonline-com.ezproxy.unal.edu.co/doi/full/10.1080/10942912.2017.1344990>

Vandenplas, Yvan., Huys, Geert & Daube, Georges. (2015). Probiotics: an update. *Journal de Pédiatrie*, 91(1), 6-21. Recuperado de <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0021755714001478?via%3Dihub>