

EFEITO DA PASTEURIZAÇÃO NAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E OXIDANTES DO LEITE HUMANO

Effect of pasteurization on the antioxidant and oxidant properties of human milk

Mariane Fioroti Lorençon^a , Racire Sampaio Silva^a ,
Romildo Azevedo Júnior^a , Marcio Fronza^{a,*} 

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da pasteurização nas propriedades antioxidantes e oxidantes do leite humano.

Métodos: Foram utilizadas 42 amostras de leite cru e após a pasteurização, para avaliação da atividade antioxidante pelos métodos da capacidade redutora do ferro e sequestro dos radicais derivados do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). A peroxidação lipídica (PL) foi estimada pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e pela avaliação dos produtos proteicos de oxidação avançada.

Resultados: Não se observou diferença significativa no leite humano cru nem após a pasteurização em relação às propriedades antioxidantes determinadas pelo método da redução do ferro ($50,0 \pm 3,4\%$ e $48,8 \pm 3,0\%$, respectivamente) e pelo sequestro dos radicais derivados do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ($28,9 \pm 1,5\%$ e $31,2 \pm 1,3\%$, respectivamente). Os resultados médios de malondialdeído [MDA] ($62,6 \pm 4,1$ e $64,3 \pm 3,6$ $\mu\text{M}/\text{mg}$) e produtos de oxidação proteica ($59,4 \pm 3,4$ e $54,2 \pm 3,8$ $\mu\text{M}/\text{L}$) entre os grupos leite fresco e leite pasteurizado, respectivamente, não evidenciaram diferença significativa.

Conclusões: Os dados demonstraram que o leite humano possui importante atividade antioxidante e que o processo de pasteurização não interfere nessa propriedade, evitando assim a peroxidação dos lipídios e a formação de produtos avançados de oxidação proteica.

Palavras-chave: Antioxidantes; Bancos de leite; Estresse oxidativo; Leite humano; Pasteurização.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of pasteurization on antioxidant and oxidant properties of human milk.

Methods: 42 samples of milk before and after pasteurisation were used to evaluate the antioxidant activity by the ferric reducing capacity and by scavenging the 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid radical. Lipid peroxidation was estimated by the concentration of malondialdehyde product using the thiobarbituric acid reactive substances assay and by the evaluation of advanced oxidation protein products.

Results: No significant difference was observed in fresh human milk and after pasteurization in relation to antioxidant properties determined by the ferric reducing capacity ($50.0 \pm 3.4\%$ and $48.8 \pm 3.0\%$, respectively) and by scavenging the 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid radical ($28.9 \pm 1.5\%$ and $31.2 \pm 1.3\%$, respectively). The results of malondialdehyde (62.6 ± 4.1 and 64.3 ± 3.6 $\mu\text{M}/\text{mg}$) and protein oxidation products (59.4 ± 3.4 and 54.2 ± 3.8 $\mu\text{M}/\text{L}$) of fresh and pasteurized milk, respectively, did not exhibited any significant difference.

Conclusions: This data showed that human milk has an important antioxidant activity and that the pasteurizing process does not influence the antioxidant capacity, avoiding the peroxidation of breast milk lipids and the formation of advanced protein oxidation products.

Keywords: Antioxidants; Milk banks; Oxidative stress; Milk, human; Pasteurization.

*Autor correspondente. E-mail: msfronza@gmail.com (M. Fronza).

^aUniversidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brasil.

Recebido em 25 de agosto de 2019; aprovado em 13 de maio de 2020; disponível on-line em 04 de agosto de 2020.

INTRODUÇÃO

A importância do leite humano na alimentação dos lactentes é inegável. Isso se deve ao fato de o leite materno ser, comprovadamente, o alimento mais completo que o bebê pode receber, pois fornece todos os nutrientes, vitaminas e minerais de que ele precisa para o crescimento nos primeiros meses. De acordo com a fase da lactação, denomina-se: colostro até o sexto dia, leite de transição até o 14º dia e leite maduro após 15 dias. Além disso, o conteúdo modifica-se durante a mamada e se o bebê é a termo ou prematuro.^{1,2}

O leite humano é uma das maneiras mais eficientes de atender aos aspectos nutricionais, imunológicos e psicológicos da criança em seu primeiro ano de vida. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda amamentação exclusiva por 4–6 meses e complementada até dois anos ou mais, sendo seguro para ser oferecido de forma exclusiva e em livre demanda, sem restrições de horários ou de quantidade. Porém, em alguns casos, essa alimentação exclusiva diretamente do seio nem sempre está disponível, recorrendo-se aos bancos de leite certificados ou às fórmulas lácteas disponíveis comercialmente.^{2,3}

Convém destacar que o uso de fórmula láctea em uma interação interfere na duração do aleitamento exclusivo, promove o aumento do estresse oxidativo (EO), além de modificar os benefícios atingidos pela microbiota intestinal desenvolvida pelo aleitamento exclusivo.^{4,5} Na falta da alimentação direta do seio materno, a recomendação pelas principais entidades competentes, incluindo a Academia Americana de Pediatria, para que não se percam os benefícios relacionados ao uso do leite humano é a utilização de leite humano cru da própria mãe para seu filho ou do leite pasteurizado encontrado nos bancos de leite.⁶⁻⁹

Estudos abordando a influência da pasteurização na manutenção de fatores biológicos vêm sendo realizados. A pasteurização tradicional (62,5°C, por 30 min) mantém o perfil proteico do leite humano sem grandes alterações.⁸ Quanto às propriedades antioxidantes, a pasteurização causou queda significativa na atividade de duas enzimas antioxidantes — superóxido dismutase e glutathione peroxidase —, enquanto o congelamento/armazenamento de leite cru afetou apenas a superóxido dismutase.⁷ Sabe-se hoje que o uso do leite materno na alimentação de lactentes pode reduzir o risco de obesidade, mesmo que seja produzido por mães obesas.¹⁰ Estudos que dizem respeito ao EO estão correlacionados com o desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e pela eficiência do sistema de defesa antioxidante. Crianças amamentadas têm demonstrado possuir uma barreira antioxidante mais eficiente quando comparadas com as crianças alimentadas com fórmulas.^{7,11,12}

As gorduras constituem a maior fonte de energia do leite humano e são tão importantes que os estudos estão sendo dirigidos de tal forma que as fórmulas lácteas buscam mimetizar seu perfil lipídico.^{13,14} Os principais ácidos graxos existentes no leite humano restringem-se àqueles com cadeias de 12 a 18 carbonos.

Entre eles, destacam-se os ácidos linoleico e linolênico, que são considerados ácidos graxos essenciais e os precursores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFA) — ácido araquidônico e ácido docosahexaenoico. O recém-nascido pré-termo, especialmente aquele de muito baixo peso, possui capacidade limitada para sintetizar os LCPUFA por meio de seus precursores, de onde se infere a importância de sua oferta pelo leite humano.^{1,13,15}

Os LCPUFA são considerados fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do cérebro, bem como para o desenvolvimento cognitivo do neonato.^{13,15} Nesse sentido, questiona-se o potencial papel do EO, resultante do desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes (radicais livres) e os mecanismos antioxidantes de defesa do organismo da puérpera e do próprio leite materno, única fonte de LCPUFA para o neonato.^{11,16} Os produtos de oxidação proteica (AOPP) também têm sido entendidos como novos marcadores de oxidação e dano às proteínas, podendo ser utilizados para estimar o dano oxidativo proteico.^{12,17} O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da peroxidação lipídica (PL) e, por ser um produto estável, pode ser utilizado como medida cumulativa desse processo.¹⁶ Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil antioxidante e oxidante do leite humano fresco e após o processo de pasteurização.

MÉTODO

As amostras de leite fresco e pasteurizado, em um total de 42, foram coletadas nos meses de março e abril de 2018 e gentilmente cedidas pelo Banco de Leite Humano do Hospital Estadual Infantil e Maternidade Dr. Alzir Bernardino Alves (HEIMABA), de Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. O tamanho amostral foi calculado considerando o dimensionamento da atividade antioxidante total. Para estimativa de variabilidade para essa característica, baseou-se em Nogueira et al., que obtiveram desvio padrão de aproximadamente 10 microMol para o teste de atividade antioxidante total (ABTS).¹⁸ Para o dimensionamento, também se levaram em conta o nível de significância de 5%, poder de 80%, magnitude de efeito de 9 microMol e teste *t* de Student pareado como teste inferencial, alcançando-se, quando da aplicação da fórmula, o tamanho mínimo de 18 amostras.

Após coleta, 25 mL de cada amostra foi transportada em caixa isotérmica à temperatura de 3 a 4°C até o laboratório da Universidade Vila Velha (UVV), onde foi imediatamente congelada a -16°C, temperatura usual de conservação do leite nos bancos de leite humano. Após um período máximo de 15 dias, todas as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e gentilmente homogeneizadas para análise. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UVV com o nº 1804463.

O processo de pasteurização foi realizado de acordo com o recomendado pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano.⁹

Para inativação dos microrganismos patogênicos e da microbiota saprófita, o leite foi aquecido a 62,5°C por 30 minutos. Durante o tempo de aquecimento, ele foi moderadamente agitado, para evitar aderências às paredes do recipiente, promover aquecimento uniforme de todas as suas partículas e, ao mesmo tempo, evitar a formação de espuma. Após resfriamento, foi armazenado na temperatura de -16°C.

Os reagentes TPTZ — 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina, persulfato de potássio, acetato de sódio tri-hidratado, ácido acético glacial, ácido clorídrico concentrado, cloreto férrico, 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), ácido tiobarbitúrico — TBA (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico — TBARS), ácido acético ultrapuro, tocoferol, albumina humana e cloramina T foram adquiridos da Sigma-Aldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram obtidos comercialmente e possuíam grau analítico.

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) modificado, como alternativa para análise de fluidos biológicos.¹⁶ Nesse método, o complexo férrico-tripiridil-triazina (Fe III-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe II-TPZ), na presença de um antioxidante em condições ácidas. O complexo formado foi determinado a 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos em porcentagem de redução do radical, sendo representativo de pelo menos dois experimentos independentes.

A atividade antioxidante das amostras de leite também foi determinada pelo método do sequestro do radical livre ABTS (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos).¹⁶ Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados expressos em porcentagem de redução do radical, sendo representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

A quantificação de proteínas totais nas amostras de leite foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos),¹⁹ e calculou-se o teor de proteínas totais no leite materno por meio de análise de regressão linear mediante a equação da reta obtida pela construção de curva-padrão albumina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em mg/mL.

O teor de PL, relacionado com o EO, foi avaliado pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico conforme descrito por Ansarin et al., com modificações.²⁰ A cada 50 µL de leite (diluído previamente na proporção 1:20 com água deionizada), foi adicionado 200 µL de ácido tiobarbitúrico (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos), e incubou-se a amostra a 100°C durante 2h30 sob agitação, para evitar a formação de cristais. Depois, 200 µL de cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços, e realizou-se a leitura das absorbâncias a 532 nm. As concentrações foram obtidas em nmol de MDA

(Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos) e posteriormente normalizadas com o teor de proteínas dosado nas mesmas amostras pelo método de Bradford. O resultado final foi expresso em nmol de MDA/mg de proteínas.

As análises do conteúdo de avaliação dos AOPP deram-se de acordo com Talukder et al.,¹² modificado, em comparação às reações de agentes oxidantes clorados (as cloraminas). As amostras foram diluídas em solução-tampão fosfato salino (na proporção 1:30 e/ou 1:50), e em seguida se adicionaram 10 µL de iodeto de potássio (KI) (1,16 M) e 20 µL de ácido acético (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, Estados Unidos). Agitou-se a placa por seis minutos, e a absorbância da reação foi imediatamente lida em 340 nm. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva-padrão de cloramina T. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de cloramina T/mg proteína.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad (San Diego, CA, Estados Unidos) e os dados expressos como média±desvio padrão (DP). Determinaram-se as diferenças estatísticas entre os grupos usando o teste *t* de Student, e valores $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A determinação da atividade antioxidante do leite materno permite a caracterização global do seu valor, possibilitando a minimização do EO nos recém-nascidos. Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* por meio de fluidos biológicos, destacando-se a técnica do FRAP (capacidade redutora do ferro), que determina o efeito antioxidante do leite, via avaliação da redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridil-triazina) a ferroso-tripiridil-triazina (Fe^{2+} -TPTZ).¹⁶ Nas análises das amostras de leite humano fresco empregando-se o ensaio do FRAP, foi observada atividade redutora média do ferro de 50%. Para as amostras de leite humano pasteurizado, constatou-se atividade redutora média de 48,8%, não verificando-se diferenças significativas entre os grupos (Figura 1).

Outro teste amplamente empregado para avaliar a atividade antioxidante em fluidos biológicos é o teste do ABTS, que monitora o decaimento do cátion radical ABTS produzido pela oxidação do $ABTS^{•+}$ quando uma amostra contendo antioxidantes é adicionada.¹⁶ Utilizando a técnica do ABTS, assim como visto no teste do FRAP, não se percebeu diferença significativa entre os grupos, conforme Figura 2.

A PL foi determinada pelo método de quantificação do TBARS. Esse ensaio é extensivamente utilizado para estimar a peroxidação dos lipídios nas membranas e nos sistemas biológicos, como o leite humano.^{21,22} Os resultados obtidos demonstraram que a PL determinada no leite fresco ($62,6 \pm 4,1$ nM/mg de proteínas) e pasteurizado ($64,3 \pm 3,6$ nM/mg de proteínas)

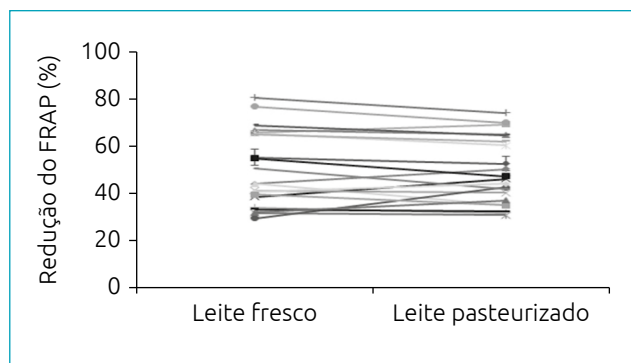


Figura 1 Atividade antioxidante do leite materno humano fresco e após o processo de pasteurização determinado pela capacidade redutora do ferro (FRAP). Valores médios±desvio padrão em porcentagem de redução do radical FRAP obtidos com o leite fresco e com o leite pasteurizado (n=21). Não se observou diferença estatística entre os grupos para $p>0,05$.

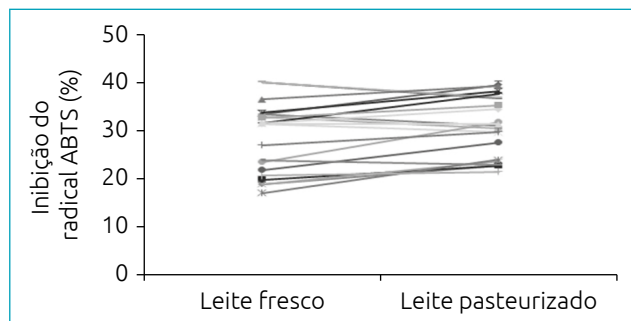


Figura 2 Atividade antioxidante do leite materno humano fresco e após o processo de pasteurização determinado pelo método do teste de atividade antioxidante total. Valores médios±desvio padrão em porcentagem de inibição do radical livre ABTS* obtidos com o leite fresco e com o leite pasteurizado (n=21). Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$).

não apresentou diferença significativa na concentração de MDA entre os grupos (Figura 3).

De acordo com o observado na Figura 4, não houve diferença significativa entre as amostras de leite fresco e após o processo de pasteurização referente aos níveis de AOPP (59,4±3,4 versus 54,2±3,8 $\mu\text{M/L}$, respectivamente).

DISCUSSÃO

Nossos resultados dos testes antioxidantes evidenciaram que tanto o leite fresco quanto o pasteurizado apresentaram importante atividade antioxidante. Diversos estudos corroboram com os achados no presente estudo, confirmando as propriedades antioxidantes do leite fresco, leite materno de mães de bebês pre-termo e termo.^{7,12,23}

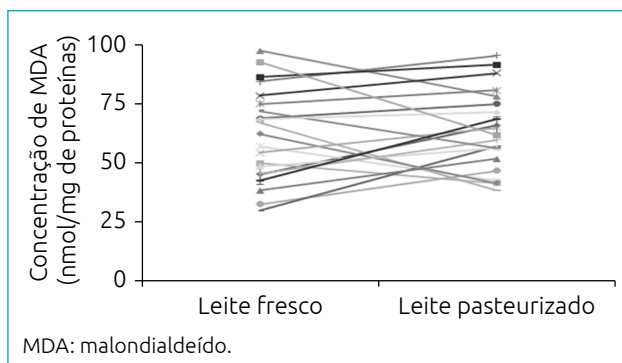


Figura 3 Concentração de malondialdeído no leite materno humano fresco e após o processo de pasteurização determinado pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Valores médios±desvio padrão em nmol de MDA/mg de proteínas obtidos com o leite fresco e com o leite pasteurizado (n=21). Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$).

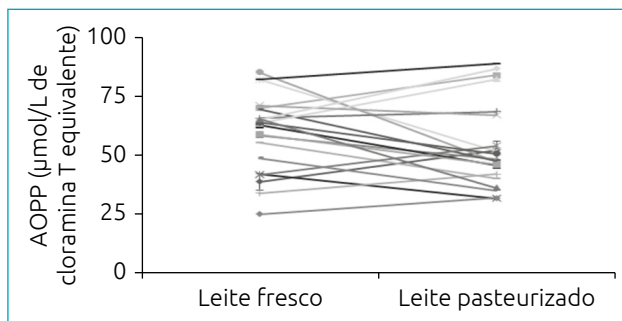


Figura 4 Avaliação dos produtos proteicos de oxidação avançada do leite materno humano fresco e após o processo de pasteurização. Valores médios±desvio padrão em $\mu\text{mol/L}$ de equivalentes de cloramina T/mg de proteínas obtidos com o leite fresco e com o leite pasteurizado (n=21). Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Pesquisas sobre a manutenção das propriedades antioxidantes do leite pasteurizado são controversas. Bertino et al.⁶ descrevem não haver alterações significativas no perfil antioxidante após o processo de pasteurização. Por outro lado, um efeito negativo do processo de pasteurização seguido do congelamento do leite materno foi observado sobre o conteúdo de fenólicos totais, acompanhado de consequente diminuição da capacidade antioxidante total nos primeiros sete dias de armazenamento.¹⁸

O leite materno contém inúmeras proteínas precursoras de peptídeos antioxidativos, muito importantes para o controle do EO, que ocorre mesmo em situações de normalidade e é agravado em situações de estresse, baixo peso ao nascimento e nos casos de internação em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), em que se faz necessário o uso do leite

materno pasteurizado, quando o leite materno ordenhado não é suficiente. Os prematuros são especificamente sensíveis aos radicais livres por causa de algumas situações peculiares, como desafio hipóxico-hiperóxico, infecções, deficiência na defesa antioxidante e altos níveis de ferro livre.^{21,24} Daí a grande importância de se oferecer um alimento que potencialize o sequestro de radicais livres, principalmente para esses pacientes de maneira especial.

A ação antioxidante do leite também é considerada de suma importância para a prevenção da PL e capacidade sequestrante de radicais livres. Neste trabalho, nem no leite fresco nem no pasteurizado se observaram índices significativos de PL. Dessa forma, infere-se que o conteúdo antioxidante do leite pode ter contribuído para minimizar ou diminuir a degradação lipídica e proteica. Corroborando com os achados do presente estudo, Silvestre et al.²³ notaram que a concentração de MDA nas amostras de leite seguem uma distribuição normal em todos os grupos e que os valores obtidos foram semelhantes nas amostras de leite fresco e pasteurizado. Em outro estudo, realizado por Terek et al. analisando o leite de mães de bebês pre-termo e termo, o TBARS também apresentou valores semelhantes entre os grupos.

Os AOPP podem ser tidos como marcadores de oxidação proteica gerados pela reação entre as proteínas e os oxidantes clorados derivados principalmente da mieloperoxidase por neutrófilos ativados.^{12,16,17} Nesse contexto, pode-se especular que o processo de pasteurização seja uma etapa importante no processo de preservação da integridade proteica e lipídica do leite materno, em função da inativação de leucócitos neutrófilos polimorfonucleares presentes nele. Em relação aos efeitos da pasteurização sobre os componentes biológicos do leite humano, uma possível explicação para a variabilidade significativa nos dados relatados na literatura científica é a heterogeneidade dos protocolos de teste e estudos (por exemplo, em termos de origem da amostra, condições de armazenamento ou métodos de análise). Outra importante fonte de variabilidade é representada pelo fato de a pasteurização do leite doador ser simulada em pequenas alíquotas em alguns trabalhos, em vez de realizada seguindo protocolos implementados pelo Banco de Leite Humano.^{8,9}

Em geral o leite pasteurizado se mantém próximo ao fresco na composição final, de acordo com a prática utilizada e preconizada pelos bancos de leite, uma vez que a pasteurização

é necessária para a proteção do recém-nascido que receberá o leite. A grande maioria de recém-nascidos que recebe esse leite pasteurizado no Brasil é constituída de bebês internados em UTINs, que já se encontram em situação de fragilidade e de estresse. Apesar dos estudos recentes demonstrando novas técnicas de pasteurização, o método de escolha e recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para a Rede Brasileira de Bancos de Leite ainda é o tradicional.^{25,26} Corroborando os resultados apresentados neste estudo, Elisia e Kitts também confirmaram que o processo tradicional de pasteurização do leite materno não afetou significativamente a capacidade antioxidante do leite humano, tampouco a oxidação lipídica no leite humano, avaliada pela determinação da concentração média de MDA nas amostras de leite humano cru e após a pasteurização.^{2,27}

Nosso estudo tem duas limitações a destacar. Primeiramente, não foi uma investigação desenhada para avaliação dos efeitos da pasteurização nos diferentes tipos de leite materno, colostro, transição e maduro. Em segundo lugar, na avaliação dos efeitos da pasteurização sobre a atividade antioxidante e pró-oxidante, levou-se em consideração apenas o tempo de congelamento inferior a 15 dias.

Com base nos resultados apresentados aqui, podemos concluir que o processo de pasteurização convencional do leite humano, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde, não alterou a atividade antioxidante nem a PL, o que pode contribuir para a prevenção ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao EO no neonato e promoção da proteção dos nutrientes importantes a ele. Uma avaliação com outras variáveis de armazenamento e outros tipos de pasteurização se faz necessária, visto que os benefícios detectados neste estudo são muito promissores no que tange à recomendação cada vez maior do uso do leite pasteurizado ou cru em substituição às fórmulas lácteas comumente usadas e que não possuem esse benefício específico, além de outros que não são descritos neste artigo.

Financiamento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Keikha M, Bahreynian M, Saleki M, Kelishadi R. Macro- and micronutrients of human milk composition: are they related to maternal diet? A comprehensive systematic review. *Breastfeed Med.* 2017;12:517-27. <https://doi.org/10.1089/bfm.2017.0048>
2. Vieira Borba V, Sharif K, Shoenfeld Y. Breastfeeding and autoimmunity: programming health from the beginning. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79:e12778. <https://doi.org/10.1111/aji.12778>

3. Kair LR, Flaherman VJ. Donor milk or formula: a qualitative study of postpartum mothers of healthy newborns. *J Hum Lact.* 2017;33:710-6. <https://doi.org/10.1177/0890334417716417>
4. Madan JC, Hoen AG, Lundgren SN, Farzan SF, Cottingham KL, Morrison HG, et al. Association of cesarean delivery and formula supplementation with the intestinal microbiome of 6-week-old infants. *JAMA Pediatr.* 2016;170:212-9. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.3732>
5. Demirci JR, Bogen DL. An ecological momentary assessment of primiparous women's breastfeeding behavior and problems from birth to 8 weeks. *J Hum Lact.* 2017;33:285-95. <https://doi.org/10.1177/0890334417695206>
6. Bertino E, Peila C, Cresi F, Maggiora E, Sottemano S, Gazzolo D, et al. Donor human milk: effects of storage and heat treatment on oxidative stress markers. *Front Pediatr.* 2018;6:253. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00253>
7. Marinković V, Ranković-Janevski M, Spasić S, Nikolić-Kokić A, Lugonja N, Djurović D, et al. Antioxidative activity of colostrum and human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;62:901-6. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001090>
8. Peila C, Moro G, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, Giuliani F, et al. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients.* 2016;8:E477. <https://doi.org/10.3390/nu8080477>
9. Peila C, Emmerik NE, Giribaldi M, Stahl B, Ruitenber JE, van Elburg RM, et al. Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64:353-61. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001435>
10. Young BE, Patinkin ZW, Pyle L, de la Houssaye B, Davidson BS, Geraghty S, et al. Markers of oxidative stress in human milk do not differ by maternal BMI but are related to infant growth trajectories. *Matern Child Health J.* 2017;21:1367-76. <https://doi.org/10.1007/s10995-016-2243-2>
11. Szlagatys-Sidorkiewicz A, Zagierski M, Jankowska A, Łuczak G, Macur K, Bączek T, et al. Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. *Early Hum Dev.* 2012;88:421-4. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.10.007>
12. Talukder S, Kerrisk KL, Gabai G, Fukutomi A, Celi P. Changes in milk oxidative stress biomarkers in lactating dairy cows with ovulatory and an-ovulatory oestrous cycles. *Anim Reprod Sci.* 2015;158:86-95. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.004>
13. Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campoy C, Cetin I, et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med.* 2008;36:5-14. <https://doi.org/10.1515/JPM.2008.001>
14. Cilla A, Quintaes KG, Barberá R, Alegría A. Phospholipids in human milk and infant formulas: benefits and needs for correct infant nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56:1880-92. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.803951>
15. Bernard JY, Armand M, Garcia C, Forhan A, De Agostini M, Charles MA, et al. The association between linoleic acid levels in colostrum and child cognition at 2 and 3 y in the EDEN cohort. *Pediatr Res.* 2015;77:829-35. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.50>
16. Vasconcelos SM, Goulart MO, Moura JB, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quím Nova.* 2007;30:1323-38. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
17. Gryszyńska B, Formanowicz D, Budzyń M, Wanic-Kossowska M, Pawliczak E, Formanowicz P, et al. Advanced oxidation protein products and carbonylated proteins as biomarkers of oxidative stress in selected atherosclerosis-mediated diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4975264. <https://doi.org/10.1155/2017/4975264>
18. Nogueira JA, Santos MM, Passos MC, Cunha LR, Parreiras PM, Menezes CC. Stability of antioxidant capacity of human milk after freezing and pasteurization. *J Food Nutr Res.* 2018;6:450-5. <https://doi.org/10.12691/jfnr-6-7-5>
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
20. Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *Bioimpacts.* 2017;5:123-7. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.20>
21. Ozsurekci Y, Aykac K. Oxidative stress related diseases in newborns. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2768365. <https://doi.org/10.1155/2016/2768365>
22. Wilinska M, Borszewska-Kornacka M, Niemiec T, Jakiel G. Oxidative stress and total antioxidant status in term newborns and their mothers. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22:736-40. <https://doi.org/10.5604/12321966.1185786>
23. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr.* 2008;97:1070-4. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00870.x>
24. Sah BN, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58:726-40. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1217825>
25. Wesolowska A, Sinkiewicz-Darol E, Barbarska O, Bernatowicz-Lojko U, Borszewska-Kornacka MK, van Goudoever JB. Innovative techniques of processing human milk to preserve key components. *Nutrients.* 2019;11:E1169. <https://doi.org/10.3390/nu11051169>
26. Escuder-Vieco D, Espinosa-Martos I, Rodríguez JM, Fernández L, Pallás-Alonso CR. Effect of HTST and holder pasteurization on the concentration of immunoglobulins, growth factors, and hormones in donor human milk. *Front Immunol.* 2018;9:2222. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02222>
27. Elisía I, Kitts DD. Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;49:147-52. <https://doi.org/10.3164/jcfn.10-142>