

Original

Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal

M. Miranda¹, M. Gormaz², F. J. Romero¹ y D. Silvestre¹

¹Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad CEU-Cardenal Herrera. ²Unidad de Neonatología. Hospital Universitario La Fé. Valencia. España.

Resumen

La leche materna es la vía óptima de alimentación del lactante durante, al menos, los primeros 6 meses de vida. Su elección se basa en el aporte de nutrientes y, de forma especial, en proporcionar al neonato diversos compuestos de acción beneficiosa que mejoran su crecimiento y le protegen frente a patologías propias de esta etapa. Estas propiedades de la leche materna justifican los procesos de manipulación previos a su ingesta, con el fin de promover y asegurar su seguimiento, tanto a nivel casero como a nivel hospitalario, de mayor importancia en lactantes prematuros y/o de bajo peso, por su destacada vulnerabilidad, a pesar de que durante estos procesos se pueden perder parcialmente algunas de sus propiedades. Es por ello que interesa conocer el efecto que los tratamientos aplicados a la leche humana ejercen sobre sus principales cualidades, como su capacidad antioxidante.

Objetivo: Este trabajo analiza la estabilidad de la capacidad antioxidante de la leche humana durante su almacenamiento a 4°C, de forma longitudinal desde su extracción hasta las 48 horas de refrigeración, así como las variaciones del pH.

Método: Se analiza la leche madura procedente de 30 mujeres sanas. El poder antioxidante de la leche se evalúa a través de los parámetros: capacidad antioxidante total y concentración de malondialdehído. Los resultados obtenidos muestran que el pH disminuye de forma creciente desde el inicio del almacenamiento, mientras que la capacidad antioxidante, con diferente comportamiento según el parámetro evaluador considerado, permanece estable durante las primeras 24 horas, a partir de las cuales se presentan cambios significativos.

Conclusiones: Cuando es preciso recurrir a la extracción y refrigeración de la leche antes de su ingesta es recomendable minimizar el tiempo de almacenamiento, procurando que no supere las 24 horas si se quiere preservar del estrés oxidativo.

(Nutr Hosp. 2011;26:722-728)

DOI:10.3305/nh.2011.26.4.4871

Palabras clave: Leche humana. Capacidad antioxidante. Refrigeración. Malondialdehído. pH.

Correspondencia: Dolores Silvestre Castelló.
Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología.
Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad CEU- Cardenal Herrera.
Edificio Seminario, s/n.
46113 Moncada. Valencia. España.
E-mail: dsilves@uch.ceu.es

Recibido: 17-V-2010.
1.ª Revisión: 24-VI-2010.
Aceptado: 22-VII-2010.

STABILITY OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND pH OF HUMAN MILK REFRIGERATED FOR 72 HOURS: LONGITUDINAL STUDY

Abstract

Maternal milk is the optimal feeding way for the infant at least for the first six months of life. Its properties include nutrients intake and, particularly, to provide the infant with several beneficial compounds improving his growth and protecting him from the diseases typical of this time period. These properties justify the manipulating processes before its intake in order to promote and warrant the adherence to it, both at the hospital and at home, being more important in premature infants and/or with low birth weight given their increased vulnerability, in spite of the fact that during these processes some of its properties may be partially lost. There exist, therefore, an interest in knowing the impact of the procedures applied to human milk on its qualitative properties, such as the antioxidant capacity.

Objective: This work assesses the stability of the antioxidant capacity of human milk during its storage at 4°C, longitudinally from its extraction until 48 h of refrigeration, as well as the pH changes.

Method: the milk from 30 healthy women was analyzed. The milk's antioxidant capacity was assessed by the following parameters: total antioxidant capacity and level of malondialdehyde. The results obtained showed that pH decreases gradually from the storage beginning, whereas the antioxidant capacity remains constant for the first 24 hours, with a different result depending on the parameter used, and thereafter significant changes were observed.

Conclusions: In case of needing extraction and storage of maternal milk before its consumption, the storage time should be minimized, preferably less than 24 hours in order to preserve the oxidative stress.

(Nutr Hosp. 2011;26:722-728)

DOI:10.3305/nh.2011.26.4.4871

Key words: Human milk. Antioxidant capacity. Refrigeration. Malondialdehyde. pH.

Introducción

La leche materna es la mejor opción en la alimentación del lactante, al menos, durante los primeros seis meses de vida. Los beneficios que aporta exceden al mero aporte de nutrientes, contribuyendo a la mejora en los sistemas defensivos y de protección del lactante frente a diversos agentes agresivos, origen de numerosas patologías. Estas propiedades son de especial importancia en la alimentación del lactante prematuro y/o de bajo peso, que por su inmadurez presenta mayor vulnerabilidad frente a dichos agentes.

Los componentes activos no nutricionales de la leche humana identificados actualmente presentan diversa naturaleza y han sido identificados como: células, oligosacáridos, proteínas, enzimas, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, hormonas y sistemas antioxidantes¹. Estos elementos mantienen su integridad tras el proceso digestivo y muestran actividad en la mucosa del lactante donde desempeñan su función, evitando la acción agresiva de microorganismos y otros agentes tóxicos².

A pesar del reconocido y unánime interés por prolongar la lactancia³, son diversas las causas que llevan a un abandono temprano, entre ellas se encuentra la incorporación de la madre a la vida laboral. En esta situación, la extracción de la leche y su almacenamiento en el domicilio permite el seguimiento de la lactancia incluso en la ausencia de la madre. Este proceder es de habitual seguimiento por la mayor parte de mujeres motivadas por continuar su lactancia a pesar de su alta laboral u otras circunstancias que impidan la alimentación directa a pecho. A su vez, esta práctica es empleada en el sistema hospitalario para la alimentación de lactantes ingresados en UCI con leche de madres donantes, procesada y almacenada en Bancos de Leche, de creciente y deseable implantación a nivel mundial, también en España.

Tal manipulación puede conducir a pérdidas en las propiedades nutricionales y funcionales de la leche, menguando parcialmente los beneficios que proporcionan y que justifican su calidad^{4,5}. Estas alteraciones han sido estudiadas por numerosos autores, aunque no suficientemente y, en la actualidad, todavía no son del todo conocidas. Así, aunque se conoce en parte la estabilidad de la capacidad antioxidante de la leche humana cuando ésta se mantiene en almacenamiento en frío, no se han encontrado estudios previos que evalúen su evolución de forma longitudinal durante la refrigeración, ni su posible relación con otros parámetros posiblemente relacionados como el pH.

La peroxidación lipídica es uno de los procesos de oxidación más importantes que se desencadenan en el organismo, por acción directa del oxígeno o de otros agentes oxidantes sobre los ácidos grasos insaturados de la membrana celular, con daños directos sobre la membrana y orgánulos celulares, liberación de radicales libres y formación de productos con carácter tóxico como el malondialdehído (MDA). El control de su

evolución y sus dañinas consecuencias es función, en el organismo, del sistema de antioxidantes obtenidos por vía endógena y fortalecido por el aporte dietético de los mismos.

El riesgo de estrés oxidativo es especialmente elevado en los neonatos, y sobretodo en el caso de prematuros, debido a la inmadurez fisiológica de sus sistemas de defensa y a su exposición a altas concentraciones del oxígeno inspirado, consecuencia de la deficiente gestión de los pulmones en temprana formación⁶.

Los radicales de oxígeno pueden contribuir al desarrollo de numerosas enfermedades propias de neonatos prematuros, como la enfermedad pulmonar crónica, enterocolitis necrotizante, retinopatía, hemorragia intraventricular y periventricular, entre otras⁷. Así, la protección demostrada en los lactantes alimentados con leche materna frente a la enfermedad enterocolitis necrotizante se relaciona con su actividad antioxidante, lo que justifica el interés en el empleo de leche de bancos para su alimentación⁷.

La oxidación de la grasa láctea requiere, como paso previo, la hidrólisis de los triglicéridos constituyentes y la liberación de los ácidos grasos, por acción de las lipasas, enzimas presentes y activas en leche humana, con el consiguiente descenso del pH. Lo que podría relacionar las variaciones del pH y el estrés oxidativo de la leche.

El presente estudio tiene por objeto analizar la evolución del estrés oxidativo de la leche humana cuando se mantiene almacenada en refrigeración a lo largo de 48 horas, condiciones recomendadas en los protocolos de manipulación, eligiendo como parámetro evaluador la capacidad antioxidante global de la leche y la concentración de malondialdehído, producto de la peroxidación lipídica y por ello considerado un buen marcador del proceso oxidativo, relacionando su contenido con el los cambios mostrados en el pH.

Objetivos

Analizar, de forma longitudinal, la evolución de la capacidad antioxidante de la leche humana, evaluada mediante: capacidad antioxidante total (CAT) y la concentración de malondialdehído (MDA), así como el pH cuando se almacena en refrigeración a 4°C durante: 0 h, 12 h, 24 h, 36 y 48 h. Estudiar la posible relación entre ambos parámetros.

Material y métodos

Mujeres donantes

El estudio se llevó a cabo con leche donada por 30 mujeres sanas, no fumadoras que acudían al Box de Lactancia de la Unidad de Neonatos del Hospital Universitario La Fé (Valencia) para la extracción de su leche con el fin de alimentar a su hijo allí ingresado.

Con la colaboración del personal técnico del box se seleccionaban las mujeres donantes de acuerdo a su disponibilidad y características, éstas eran informadas sobre el interés y objeto del estudio y, en su caso, daban su consentimiento para participar en él. La recogida de muestras se llevó a cabo con la aprobación de la Comisión Ética del Hospital.

Recogida de muestras

Se analizaron 30 muestras de leche madura, recogidas bajo condiciones estandarizadas con el fin de eliminar al máximo las fuentes de variabilidad entre ellas⁸. La extracción se llevó a cabo, bajo la supervisión del personal técnico del box de lactancia del citado hospital, en horario de mañana entre las 9 y las 13 h, con ayuda de sacaleches automático con regulador de vacío (MAMILAT SM 122), directamente sobre recipiente de polipropileno, evitando así su contaminación. Tras la extracción, las muestras se trasladaban inmediatamente a la Universidad CEU-Cardenal Herrera, ubicada en Moncada (Valencia), para su análisis, en todo momento bajo condiciones de refrigeración y en oscuridad, con el fin de evitar el proceso oxidativo durante este breve periodo.

Procesado de las muestras

En base a estudios previos que confirmaron la estabilidad de la capacidad antioxidante de la leche humana cuando ésta se mantiene en congelación a -20°C durante 10 días⁹, el procesado de las muestras se diseñó de la siguiente forma: cada muestra se dividía en 5 alícuotas de unos 3-4 mL cada una y se identificaban. Una de ellas se sometía a control inmediato, leche fresca, y el resto para su análisis tras mantener el refrigeración a 4°C durante 12 h, 24 h, 36 h y 42 h, respectivamente. A cada tiempo se procedía a la determinación del pH y posterior congelación de la alícuota a -20°C. En un tiempo inferior a 5 días se descongelaban y se sometían al resto de determinaciones según los métodos seguidamente indicados.

Ensayos bioquímicos

La determinación de pH se realizó en todas las muestras, por medida potenciométrica con pH-metro Basic 20 (Crisol).

La concentración de MDA se determinó en las cinco alícuotas de 16 muestras, como producto de peroxidación lipídica por cromatografía líquida de acuerdo a la modificación sobre el método de Richard y cols.¹⁰ puesto a punto previamente¹¹.

La capacidad antioxidante total se evaluó en las cinco alícuotas de 14 muestras mediante el kit comercial (Antioxidant Assay kit (Cayman Chemical Co. Ann Arbor, MI)). El ensayo se basa en la cuantificación

de la capacidad de los antioxidantes en la muestra por inhibición de la oxidación del radical ABTS + y comparación con la del Trolox, un análogo del tocoferol soluble en agua, y se cuantificó como milimoles equivalentes de Trolox.

Análisis estadístico

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó con ayuda del programa Statgraphics Plus 5.0. Las diferencias estadísticas se consideran con una probabilidad del 95% ($p < 0,05$).

Los valores se expresan en valor medio \pm desviación estándar. La normalidad de las poblaciones estudiadas se confirmó mediante la aplicación del test de Kolmogorov ($p > 0,100$), con el fin de poder analizar los datos con análisis de la varianza (ANOVA).

El efecto del tiempo de permanencia en refrigeración se evaluó teniendo en cuenta la variabilidad debida a la mujer donante, efectuando para ello un ANOVA de dos factores y posterior test de LDS (test de mínima diferencia significativa, prueba empleada por el programa informático Statgraphics para localizar las diferencias significativas tras la aplicación de la ANOVA). La relación entre parámetros se evaluó mediante regresión lineal.

Resultados

Los valores medios de los parámetros evaluados, para cada etapa de refrigeración considerada se muestran en la tabla I.

Todas las poblaciones estudiadas, en los tres parámetros analizados, mostraron una distribución normal, lo que permitió aplicar ANOVA multifactorial como pruebas estadística.

El estudio longitudinal de la evolución de los parámetros mostró los siguientes resultados:

Los valores de pH en leche fresca presentaron una amplia variabilidad, con valor máximo de 7,68 y mínimo de 7,07, siendo la mediana 7,56.

El pH de la leche presenta variaciones altamente significativas para los dos factores analizados: mujer donante y tiempo de almacenamiento ($p = 0,0000$, en ambos). El pH desciende desde leche fresca hasta el final del estudio de forma progresiva y significativa entre cualquiera de las etapas consideradas, como puede observarse en la figura 1. Así, el pH es máximo en leche fresca ($7,50 \pm 0,16$) y, a partir de este momento, desciende bruscamente, presentando en cada una de las etapas un valor significativamente mayor que en la siguiente, obteniendo el mínimo valor de pH a las 48 horas de extracción ($6,70 \pm 0,19$). El pH a cada tiempo de refrigeración es significativamente inferior al de la etapa anterior, teniendo en cuenta las diferencias también significativas, que presenta el pH de las madres donantes entre ellas.

Tabla I
pH, concentración de MDA y capacidad antioxidante total, en leche fresca y en leche mantenida a 4° C durante 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. (Valor medio ± desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento	pH (21 valores = todos)	MDA (µM)	CAT (mmoles equivalentes de Trolox)
Fresca	7,50 ± 0,16	1,15 ± 0,07	68,55 ± 15,74
12 h	7,28 ± 0,15	1,36 ± 0,23	67,48 ± 18,58
24 h	7,09 ± 0,22	1,70 ± 0,49	63,07 ± 14,87
36 h	6,83 ± 0,26	2,50 ± 0,32	67,78 ± 17,81
48 h	6,70 ± 0,19	2,47 ± 1,02	63,02 ± 20,56

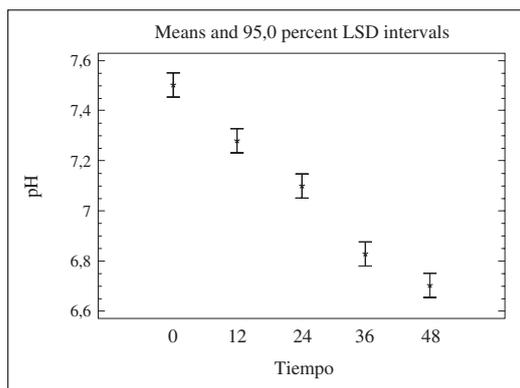


Fig. 1.—pH de leche humana: evolución longitudinal. Leche fresca (punto 0) y leche mantenida a 4° C durante 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. Intervalos para la media. Test LSD.

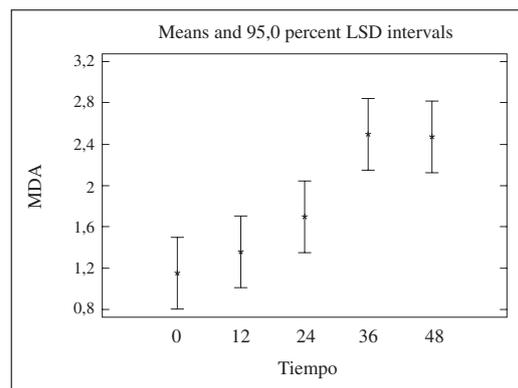


Fig. 2.—Concentración de malondialdehído (MDA, µM) en leche humana: evolución longitudinal. Leche fresca (0 h) y leche mantenida a 4° C durante 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. Intervalos para la media. Test LSD.

Los valores de MDA leche fresca presentaron una amplia variabilidad, con valor máximo de 1,09 y mínimo de 1,28, siendo la mediana de 1,15.

En la tabla I puede comprobarse el incremento de la concentración de MDA que se obtuvo a lo largo del estudio. La aplicación del ANOVA multifactorial indica que los cambios presentados en este marcador de oxidación lipídica son estadísticamente significativos en relación al tiempo de almacenamiento en refrigeración ($p = 0,0015$), pero no respecto a la variabilidad encontrada entre las mujeres donantes (NS). Las diferencias existentes entre las etapas analizadas se evidenciaron por aplicación posterior del test LDS (fig. 2). Como puede observarse en la figura 2, la concentración de MDA aumenta ligeramente desde el inicio, en leche fresca ($1,15 \pm 0,07$ mM), aunque este incremento no es significativo durante las primeras 24 horas de refrigeración. A partir de este punto, si la refrigeración se prolonga hasta las 36 horas, la concentración obtenida de MDA alcanza valor $2,50 \pm 0,49$ mM, aumento significativo estadísticamente respecto a los anteriores, permaneciendo constante a partir de aquí hasta el final del estudio.

Al igual que los parámetros anteriormente evaluados, la CAT obtenida en leche fresca presentó una amplia variabilidad, con valor máximo de 90,95 y mínimo de 39,45, siendo la mediana 73,80. Como puede

comprobarse en la tabla I, la determinación de la capacidad antioxidante global de la leche humana presenta una gran variabilidad en todas las poblaciones analizadas. El análisis estadístico multifactorial indica variaciones significativas entre las mujeres donantes ($p = 0,0000$), sin embargo no los son en relación al tiempo de almacenamiento (NS), indicando que la capacidad antioxidante global permanece sin cambios significativos desde el inicio, leche fresca hasta el final del estudio, tras refrigeración durante 48 horas, tal como muestra la figura 3.

La posible relación entre los parámetros evaluadores de la capacidad antioxidante de la leche y el pH de la misma se analizó por aplicación de un análisis de regresión lineal.

Los resultados encontrados no mostraron relación significativa entre el pH y la CAT en leche humana. Sin embargo, el descenso en el pH sí se relaciona, inversamente, con la concentración de MDA según la siguiente ecuación:

$$\text{MDA} = 11,3058 - 1,35819 \cdot \text{pH}$$

En la figura 4 se muestra la representación del análisis de regresión lineal entre los valores de pH y MDA obtenidos en la evolución longitudinal en leche

las 48 horas de almacenamiento. Este resultado discrepa, o al menos no era de esperar dado el conocido efecto que la permanencia de la leche humana en estas condiciones tiene sobre la estabilidad y actividad de algunos de los compuestos con acción antioxidante, contribuyentes a esta propiedad^{8,9,17,18}.

La acidez de la leche es un parámetro de control de calidad muy valorado en la manipulación en bancos de leche, determinándose como grados dórníc o como pH. El empleo de la titulación dórníc es de mayor uso y frecuencia¹⁹.

Es conocida la caída del pH de leche humana durante su almacenamiento^{8,20,21}, tanto si el almacenamiento se realiza en refrigeración como en congelación. Nuestro trabajo obtiene resultados concordantes con dichos estudios. En leche fresca se han encontrado pH entre 7,07 y 7,68, valores máximo y mínimo ($7,50 \pm 0,16$ como media), datos ligeramente superiores a los publicados previamente²³ e incluidos en el rango obtenido por otros autores²¹. Cuando la leche se almacena en frío, desde el inicio se presenta una marcada y significativa disminución del pH, así a las 24 horas de almacenamiento el pH medio es de $7,09 \pm 0,22$, habiendo pues descendido -0,41 unidades, respecto al valor inicial. El trabajo publicado por Hedge y Vikiyath, 2007²², realiza el seguimiento del pH durante este periodo, mostrando similar comportamiento del pH aunque con menor pendiente de descenso (-0,17 unidades de pH de diferencia) entre leche refrigerada 24 h y leche fresca). Resultados así mismo concordantes con otros autores^{8,20}. Nuestro estudio prolonga el periodo de almacenamiento durante más tiempo, observando que la caída de pH se mantiene bruscamente durante todo el periodo evaluado, alcanzando el mínimo valor ($6,70 \pm 0,19$) a las 48 h. Igualmente esta bajada de pH se prolonga en otros estudios hasta tiempos más largos como 8 días de refrigeración¹⁸.

Así, estos resultados confirman que la leche humana aumenta su acidez desde el inicio de su refrigeración, tanto más cuanto mayor es el tiempo de mantenimiento.

Al margen de la relación que el aumento de la acidez de la leche pueda mantener con el desarrollo de microorganismos, relación valorada en algunos estudios²¹, el aumento de acidez desencadenado durante la refrigeración tiene su origen en el incremento de ácidos grasos libres que conlleva la actividad de las enzimas lipasas presentes en la leche y activas a pesar de las bajas temperaturas, incluso en congelación²². La actividad lipasa es mayor y con ello el descenso de pH si la leche se almacena a temperatura ambiente entre 15 a 25°C²⁵.

El aumento de ácidos grasos libres, especialmente insaturados registrado en diversos trabajos^{12,24}, puede llevar a un aumento del proceso oxidativo y con ello la formación de productos de oxidación como MDA. En base a ello, en este trabajo se ha tratado de relacionar las variaciones entre ambos parámetros: pH y concentración de MDA, no habiendo encontrado estudios pre-

vios que traten de relacionarlas. Los resultados obtenidos confirman una relación lineal inversa entre ambas con fuerte significación estadística, de forma que el descenso de pH conlleva un aumento en la concentración de MDA.

Sin embargo no hay relación entre la variación del pH con la capacidad total antioxidante, aunque este resultado parece poco concluyente dada la elevada variabilidad interindividual de la CAT, lo que impide sacar conclusiones al respecto y precisa, para su confirmación, nuevos estudios con mayor número de muestras.

En base a los resultados expuestos y con el fin de paliar estas modificaciones parece aconsejable inactivar las enzimas lipasas, desencadenantes de estas alteraciones con la liberación de ácidos grasos de sus estructuras originales en los triglicéridos, con el tratamiento térmico como la pasteurización²⁵.

Los resultados obtenidos en este trabajo justifican la recomendación de disminuir en lo posible el tiempo de almacenamiento de leche en refrigeración. Cuando la mujer debe proceder a almacenar su leche antes de la ingesta del lactante, el periodo no debería superar las 24 horas con el fin de mantener la integridad de su componente lipídico y evitar sus alteraciones.

Agradecimientos

Financiado por el Programa de Investigación Cooperación-Santander (PRCEU-UCH/COP01/08) de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Referencias

1. Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez J, Boza JJ. Componentes biológicamente activos de la leche materna. *Ars Pharmaceutica* 2001; 42: 21-38.
2. Klemola T, Savilahti E, Leinikki P. Mumps IgA antibodies are not absorbed from human milk. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 230-232.
3. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr19/es/index.html>. (fecha de consulta 11 de mayo de 2010).
4. Silvestre D, Ferrer E, Gaya J, Jareño E, Miranda M, Muriach M, Romero FJ. Available lysine content in human milk: stability during manipulation prior to ingestion. *Biofactors* 2006; 26: 71-79.
5. Lawrence RA. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 88: 14-18.
6. Korchazhkina O, Jones E, Czaundera M, Spencer SA. Effects of exclusive formula or breast milk feeding on oxidative stress in healthy preterm infants. *Arch Dis Child* 2006; 91: 327-329.
7. Thibeault DW. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol* 2000; 17: 167-181.
8. Silvestre D, Lagarda MJ, Farré R et al. A study of factors that may influence the determination of copper, iron, and zinc in human milk during sampling and in simple individuals. *Biol Trace Elem Res* 2000; 76: 217-227.
9. Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Bosch-Morell F, Romero FJ, Silvestre D. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors* 2004; 20: 129-137.
10. Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High performance liquid chromatography separation of malondialdehyde thibarbituric

- acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 1992; 577: 9-18.
11. Romero MJ, Bosch-Morell FJ, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 993-997.
 12. Van Zoeren-Grobbe D, Moison RM, Ester WM, Berger HM. Lipid peroxidation in human milk and infant formula: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatr* 1993; 82: 645-649.
 13. Ermis B, Yildirim A, Ors R, Tastekin A, Ozkan B, Akcay F. Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and antioxidant potential levels in mothers at the postpartum seventh day. *Biol Trace Elem Res* 2005; 105: 27-36.
 14. Ankrah N, Appiah-Opong R and Dzokoto C. Human breastmilk storage and the glutathione content. *J Trop Pediatr* 2000; 46: 111-113.
 15. L'Abbe MR and Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31: 270-274.
 16. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jereño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr* 2008; 97: 107-114.
 17. Turoli D, Testolin G, Zanini R, Bellu R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr* 2004; 93: 1569-1574.
 18. Buss IH, McGill F, Darlow BA, Winterbourn CC. Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr* 2001; 90: 813-815.
 19. <http://www.redeBLH.fiocruz.br> (fecha consulta 11 de mayo de 2010).
 20. Ogundele MO. Effects of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 205-211.
 21. Hedge AM, Vikyath R. Cariogenic potential of stored human milk—an in-vitro study. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 32: 27-32.
 22. Lavine M and Clark RM. Changing patterns of free fatty acids in breast milk during storage. *J Pediatr Gastroenterol and Nutr* 1987; 6: 769-774.
 23. Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, Henderson TR, Hamosh P. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics* 1996; 97: 492-498.
 24. Lepri L, Del Bubba M, Maginni R, Donzelli GP, Galvan P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 19: 1-10.
 25. Henderson TR, Fay TN, Hamosh M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr* 1998; 132: 876-878.