

Propiedades antioxidantes de la leche materna humana.

Human milk antioxidant properties.



Trabajo de Fin de Grado

GRACIELA RODRÍGUEZ CASTELLANO

Tutorizado por Dra. Ana Bolaños Martín y Lic. Sara García Ravelo.

Grado en Biología. Junio 2017

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso Académico: 2017/2018

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 42229331C

Graciela Rodriguez Castellano

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Propiedades antioxidantes de la leche materna humana

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Ana Bolaños Martin

Profesor/a del Departamento de Biología Animal y Edafología y Geología

y D./Dña. Sara Garcia Ravelo

Cotutora

Autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado

Fdo.: Ana Bolaños

Fdo.: Sara Garcia

La Laguna, a 2 de Julio de 2018

Firma del interesado/a

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Composición de la leche materna..... | 3 |
| Ácidos grasos esenciales | 5 |
| Oxidación lipídica | 7 |
| Rancidez | 9 |
| Productos de oxidación de la grasa láctea | 10 |
| Sistemas antioxidantes..... | 11 |
| Antioxidantes enzimáticos de la leche materna..... | 13 |
| Antioxidantes no enzimáticos de la leche materna..... | 14 |
| Efecto del almacenamiento de la leche en su capacidad antioxidante total | 19 |
| Conclusiones..... | 23 |
| Conclusions | 24 |
| Bibliografía..... | 25 |

RESUMEN

La leche materna se caracteriza por presentar una serie de componentes y propiedades importantes para el correcto desarrollo y crecimiento de los recién nacidos. La Asociación Española de Pediatría recomienda amamantar a los bebés al menos durante 6 meses, pero la incorporación de las madres a la vida laboral o el ingreso de neonatos dificultan esta actividad. Si bien, el almacenamiento de la leche facilita a las madres continuar con la lactancia.

Su importancia nutricional recae principalmente en su perfil lipídico que aporta energía, destacando su contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA; Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids) n-6 y n-3, los cuales son de gran relevancia en el desarrollo de la retina y el cerebro del bebé.

Los antioxidantes presentes en la leche materna juegan un papel importante en su conservación, evitando la oxidación de sus componentes (principalmente los lípidos) y la pérdida de sus propiedades. Además de contribuir a la dotación de antioxidantes al recién nacido.

El objetivo de esta revisión bibliográfica fue estudiar las propiedades de los antioxidantes contenidos en la leche materna, y la gran importancia que presentan en la conservación de su calidad mediante la prevención de la peroxidación lipídica de los LC-PUFA. Además, se estudia cómo estas propiedades pueden verse alteradas por el almacenamiento prolongado, ya sea por refrigeración o congelación.

PALABRAS CLAVES: Leche materna, almacenamiento, propiedades antioxidantes, peroxidación lipídica, LC-PUFA (long chain polyunsaturated fatty acids).

ABSTRACT

Breast milk provides several components with important properties for the correct newborn development and growth. The Spanish Association of Pediatrics recommends breastfeed the babies for at least 6 months, but the return to work of mothers or newborns hospitalization may limit this activity. However, milk storage makes easier to continue breastfeeding the baby.

Human milk nutritional value is linked to its lipid profile which provides energy, and especially important is its content of n-6 and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) due to its essential role in brain and retinal development.

Moreover, human milk antioxidants have an important role in their conservation mainly by preventing oxidation processes (mainly lipids) and therefore preserving their properties. Also, it provides the newborn with antioxidants.

The objective of the present review was to study the human milk antioxidant system, and its relevance by preventing LC-PUFA lipid peroxidation. The effect of prolonged storage (refrigeration or freezing) of human milk on its antioxidant properties was also studied.

KEYWORDS: Breast milk, storage, antioxidants properties, lipid peroxidation, LC-PUFA (long chain polyunsaturated fatty acids).

COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA

La leche materna es un producto de gran complejidad biológica, con propiedades protectoras e inmunomoduladoras que aseguran el correcto desarrollo del lactante (1). La composición de este fluido es muy dinámica y está controlada por mecanismos de regulación neuroendocrina, donde intervienen células, nutrientes y sustancias químicas (2).

Durante la lactancia se pueden diferenciar tres tipos de leches: la leche pretérmico (en caso de parto prematuro), el calostro (durante los 3 a 4 días después del parto), la leche de transición (entre 4° y 15° días postparto) y la leche madura a partir de 15° días postparto (3).

El calostro se trata de un líquido amarillento y espeso de alta densidad y poco volumen. Este produce unas 67 kcal/100 ml y es rico en proteínas, vitaminas liposolubles (E, A, K), carotenos y algunos minerales como sodio y zinc. Su principal función es inmunológica, pues transfiere inmunidad pasiva al recién nacido mediante absorción intestinal de componentes inmunológicos (linfocitos, macrófagos, IgA), además de oligosacáridos y lactoferrina. La IgA y la lactoferrina presentan una producción diaria de 2-3 g. Mientras que, los oligosacáridos se encuentran en una concentración de 20g/L (3). El lactante puede consumir más de 1.000 leucocitos maternos por día, de los cuales alrededor del 80% de las células del calostro son macrófagos, originados a partir de los monocitos de la sangre periférica que sale del torrente sanguíneo, y migran a la leche a través del epitelio mamario. Además, los complejos IgA-antígeno de la leche humana son procesados por las células dendríticas del intestino del recién nacido, permitiendo el reconocimiento del antígeno y el mantenimiento de un entorno no inflamatorio. (4).

Una mujer puede producir de 700 a 900 ml/día de leche madura durante los 6 primeros meses postparto, aportando 75 Kcal/100 ml. Esta se estructura en tres fracciones: emulsión, suspensión y solución, y su composición varía por muchos factores. Por ejemplo, al inicio de la toma el lactante recibe una leche elaborada principalmente por compuestos hidrosolubles, que posteriormente darán paso a los constituyentes liposolubles de la fracción de emulsión. De este modo, el recién nacido recibe un alimento dinámico con características distintas y ajustadas al momento en el que ocurre la toma (1).

La fracción suspensión está compuesta por proteínas, así como calcio y fósforo (1); y la fracción solución presenta un 88% de agua, vitaminas liposolubles (A, D, E y K), carbohidratos (oligosacáridos, glucopéptidos, glucosa, galactosa y lactosa) y proteínas del suero (alfa-lactoalbúmina, seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferrina, lisozima, enzimas, moduladores del crecimiento, hormonas y prostaglandinas) (3).

La fracción emulsión aporta aproximadamente el 50% de las calorías totales y energía para el bebé, y está constituida por grasas, ácidos grasos libres, vitaminas y otros componentes liposolubles como el colesterol y los antioxidantes. La grasa de la leche materna presenta una forma globular rodeada por una membrana hidrofílica constituida por colesterol, fosfolípidos y glicoproteínas, originada en la célula alveolar de la glándula mamaria. Esta estructura minimiza la saponificación, mejora la digestión y absorción de los nutrientes, y permite la coexistencia de las grasas y lipasas que permiten al recién nacido emplear los lípidos como principal fuente de energía (1). (Figura 1). Los lípidos de la grasa láctea están formados en un 98% por triglicéridos (TG) siendo el ácido oleico (18:1 n-9, 32,8%) y palmítico (16:0, 22,6%) los ácidos grasos mayoritarios que lo componen. Además, proporciona un aporte balanceado de ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3, fundamentales para la síntesis equilibrada de los eicosanoides. (2).

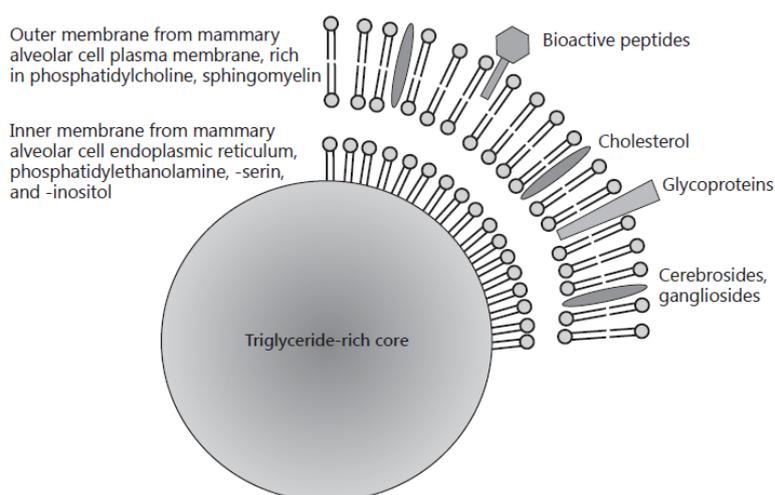


Fig. 1 Representación del glóbulo de grasa de la leche materna. (Koletzko, 2016)

Los ácidos grasos saturados representan el 42 a 47% y los insaturados el 53 a 58%, siendo el ácido oleico (18:1, n-9) el predominante (32.8%). Los ácidos grasos polinsaturados de cadena larga, abundantes en el cerebro y retina del neonato, en especial el ácido araquidónico (ARA; 20:4 n-6) y docosahexaenoico (DHA; 22:6 n-3), constituyen un 0.40% y un 0.31% de la leche respectivamente (2).

ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

Los lípidos, conocidos como grasas, se han definido como un grupo de moléculas orgánicas que se caracterizan por ser hidrofóbicos o insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Dentro de los lípidos incluimos los ácidos grasos y sus derivados, así como las sustancias funcionales o biosintéticas relacionadas con estos compuestos (5).

Los lípidos más sencillos son los ácidos grasos constituidos por un grupo hidrofílico (hidrofilo) unido al extremo de una cadena hidrocarbonada. Los ácidos grasos se clasifican en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada, el grado de insaturación (número de dobles enlaces) y la posición de los dobles enlaces. Habitualmente, presentan un número par de átomos de carbono (de 12 a 24 átomos de carbono) pudiendo ser saturados, o insaturados y contener uno o más dobles enlaces (monoinsaturados o poliinsaturados, respectivamente). (Figura 2)

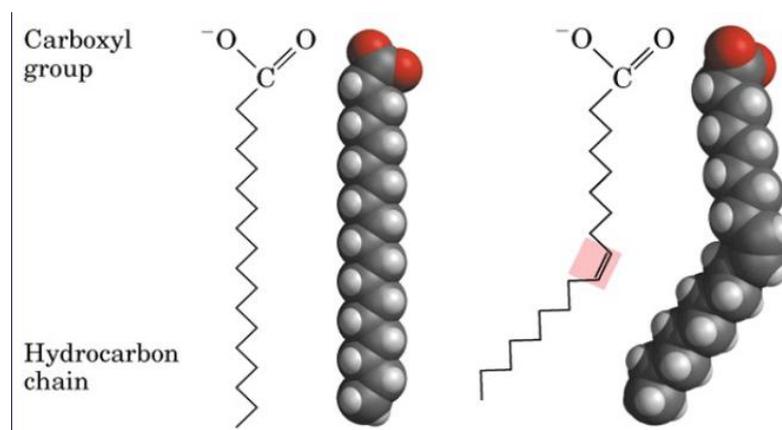


Fig. 2 Izquierda: ácido graso saturado. Derecha: ácido graso insaturado

Para referirnos a los ácidos grasos insaturados se emplea la notación “omega” (ω) o “n”, siendo el carbono ω/n el correspondiente al último carbono de la cadena y la posición del primer doble enlace a partir del carbono más cercano al metilo terminal. Así los ácidos grasos insaturados se denominan como n-3, n-6 y n-9, principalmente. Dentro de los ácidos grasos n -3 destacan el α -linolénico (ALA) 18:3 n-3, el ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5 n-3 y el ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6 n-3. Entre los ácidos grasos n-6 nos podemos encontrar con el ácido linoleico (LA) 18:2 n-6 y el ácido araquidónico (AA) 20:4 n-6 (5). (Figura 3)

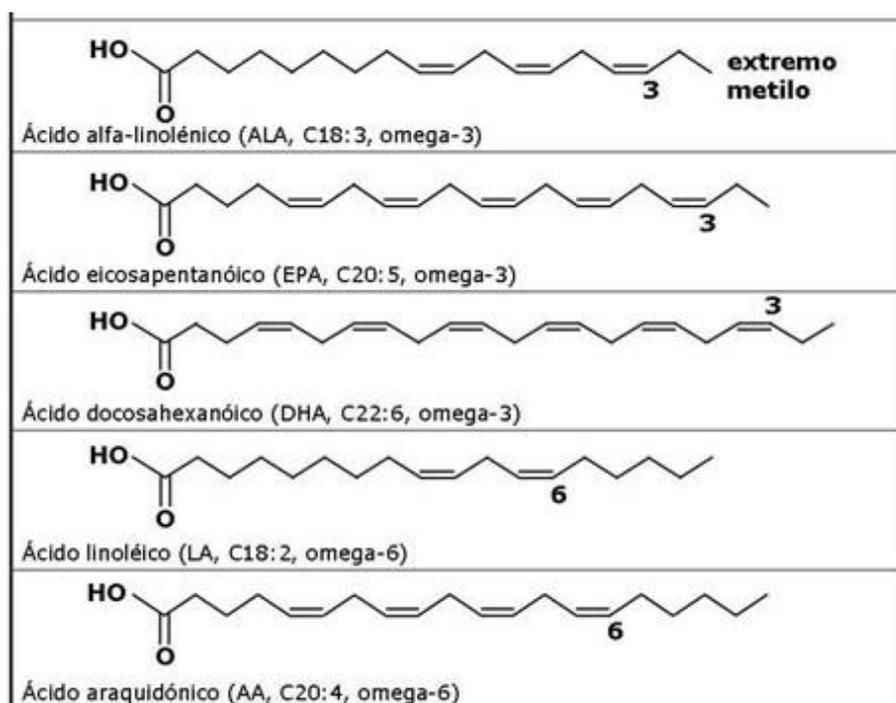


Fig. 3 Estructura molecular de los principales ácidos grasos ω -3 y ω -6. (EUFIC, 2009)

LA y ALA son ácidos grasos esenciales (EFA-Essential Fatty Acids) dado que el organismo, incluido el cuerpo humano, es incapaz de sintetizarlos. Si bien, éstos compiten entre sí por las enzimas Δ -5 y Δ -6 para su conversión en ácidos grasos omega 6 y 3 de cadena larga funcionalmente importantes, conocidos como LC-PUFA (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids). Estos están constituidos por 20 átomos de carbono o más, presentando más de dos dobles enlaces (6). (Figura 4)

Ruta de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en animales

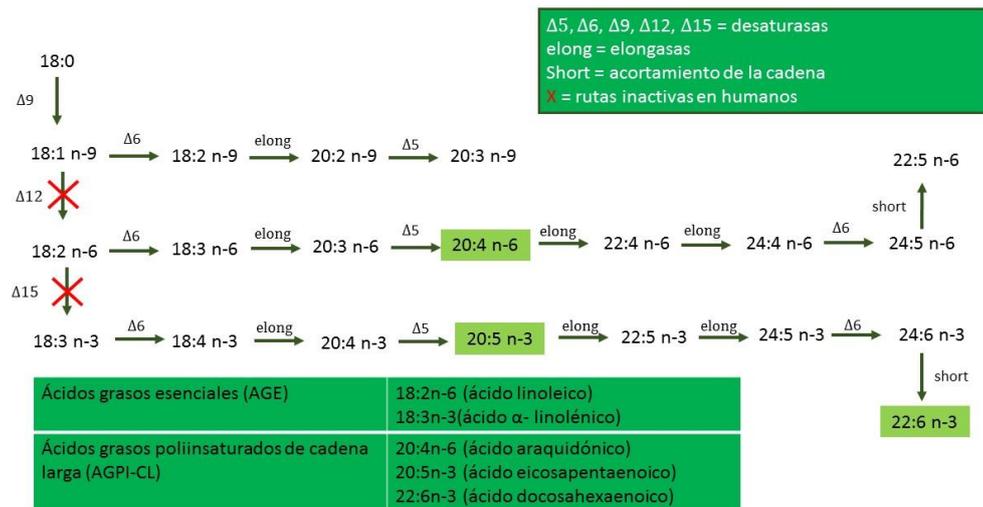


Fig. 4 Ruta de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en animales. (Mourais, et al., 2015)

Entorno al 0.2% - 5% del ALA (de 18 átomos de carbono) se convierte en EPA (de 20 átomos de carbono) y solo 1% se transforma en DHA (de 22 átomos de carbono); mientras que el LA se convierte en ARA en muy bajas concentraciones. Como resultado, el EPA, DHA y ARA son considerados ácidos grasos esenciales y deben estar incluidos en la dieta. A partir de los ácidos grasos de 20 átomos de carbono se forma una familia de moléculas lipídicas bioactivas llamadas eicosanoides con importantes funciones biológicas y, por tanto, de relevada importancia en la salud humana. A partir del EPA se generan eicosanoides con propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antiarrítmicas y vasodilatadoras. Y a partir del AA se forma un grupo de eicosanoides con propiedades proinflamatorias y protombóticas (6).

Oxidación lipídica

Los lípidos son las biomoléculas más susceptibles al proceso de oxidación, especialmente los ácidos grasos polinsaturados (AGPI). La degradación mediada por oxígeno de estos lípidos se conoce como peroxidación lipídica, proceso en el cual radicales libres atacan a estos lípidos mediante la sustitución de un hidrógeno por un oxígeno en uno de los carbonos, dando lugar a radicales peroxilo lipídicos e hidroperóxidos (7).

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas, que se originan principalmente en la mitocondria debido a la cadena de transporte electrónico. Son la mayoría especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species), como pueden ser anión superóxido (O_2^-), anión hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entre otros; o especies reactivas de nitrógeno (RNS, Reactive Nitrogen Species), como puede ser el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito. Generalmente, los ROS pueden dañar proteínas o ácidos grasos poliinsaturados, causar mutaciones en el ADN, oxidar la membrana de los fosfolípidos y modificar lipoproteínas de baja densidad (8). (Figura 5)

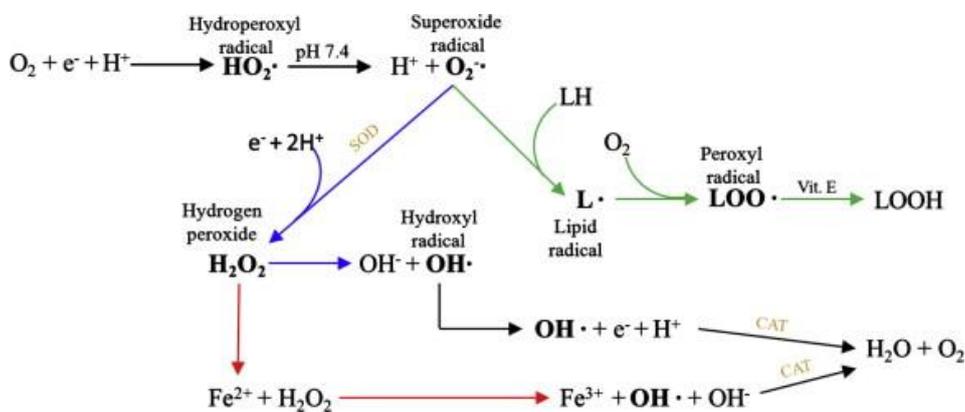


Fig. 5 Formación de Radicales libres. (Carocho & Ferreira, 2013)

En general, el proceso de peroxidación de lípidos consta de tres pasos: iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación los prooxidantes como es el radical hidroxilo reduce el hidrógeno alílico formando el radical lipídico (L^\cdot) en el centro de la molécula. En la etapa de propagación, el L^\cdot reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peróxido lipídico (LOO^\cdot), que a su vez extrae un hidrógeno de otra molécula lipídica, generando un nuevo L^\cdot y un hidroperóxido lipídico ($LOOH^\cdot$), dando lugar a una reacción en cadena de oxidación de los AGPI. Sin embargo, este proceso puede ser frenado (etapa de terminación) mediante la acción de sustancias antioxidantes (7) (Figura 6).

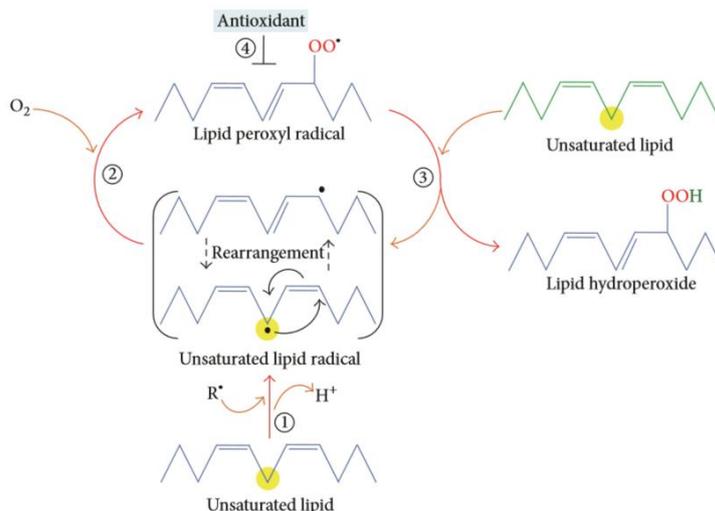


Fig. 6 Proceso de peroxidación lipídica. (Ayala *et al.*, 2014)

Rancidez

El concepto de rancidez hace referencia a los diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos. Las grasas y aceites son susceptibles a distintas reacciones de deterioro, las cuales producen compuestos volátiles que conducen a olores y sabores característicos, así como la reducción del valor nutritivo de estos alimentos (9). Sin embargo, dentro de la rancidez diferenciamos dos tipos: rancidez hidrolítica y oxidativa.

Rancidez hidrolítica

La rancidez hidrolítica se caracteriza por producir un incremento de la acidez debido a la hidrólisis enzimática que conduce a la liberación de ácidos grasos presentes en los triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos. Asimismo, estos ácidos grasos libres modifican la fracción lipídica, repercutiendo en las características organolépticas provocando aromas y sabores típicos (10).

En la leche, este tipo de rancidez es causada por la hidrólisis de los triacilglicéridos, dando como resultado la liberación de ácidos grasos libres (AGL). De este modo, los AGL de cadena más corta, principalmente de 4 a 12 carbonos, aportan el sabor rancio, en comparación con aquellos de cadena más larga, mayoritariamente de 14 a 18 carbonos los cuales no generan sabores tan fuertes (11).

La leche humana contiene dos lipasas, una lipoproteína lipasa y una lipasa dependiente de sales biliares. La lipoproteína lipasa interviene en el metabolismo materno permitiendo la extracción de los lípidos sanguíneos por las células mamarias, y sin función conocida en la digestión de la grasa láctea. Mientras que, la lipasa estimulada por sales biliares es importante para la digestión y absorción de las grasas del lactante, una vez se activa en el intestino en presencia de sales biliares **(12)**.

Rancidez oxidativa

A diferencia de la rancidez hidrolítica, en este tipo de rancidez están implicadas las grasas insaturadas, las cuales confieren unos sabores, olores, colores y texturas que hacen al alimento desagradable y en la mayoría de los casos incomedible. Esta rancidez a su vez puede diferenciarse en una rancidez sin intervención de enzimas (autooxidación; debido a la presencia de radicales libres, los cuales se introducen en la cadena insaturada de un ácido graso provocando la formación de peróxidos) o la mediada por enzimas (lipoxigenasas; llevan a cabo una oxigenación de los ácidos grasos) **(11)**.

Productos de oxidación de la grasa láctea

Existe una amplia variedad de productos asociados al proceso de la peroxidación lipídica, tales como son los hidroperóxidos lipídicos (LOOH), el malondialdehído (MDA), el propanal, el hexanal y el 4-hidroxinonenal (4HNE). El MDA parece ser el producto más mutagénico, siendo empleado como biomarcador de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados debido a su fácil reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Mientras que el 4-HNE es considerado el producto más tóxico de éste tipo de proceso oxidativo **(7)**.

En relación a la cuantificación del daño oxidativo de los lípidos de la leche humana se miden los niveles de peróxidos lipídicos, así como el contenido de sustancias reactivas al TBA mediante la cuantificación de la concentración del MDA **(16)**. Esta prueba consiste en la reactividad del TBA hacia el MDA formando aductos MDA-TBA con fluorescencia que es cuantificada por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría **(7)**.

SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar partículas ROS e inhibir la producción en cadena de más especies reactivas. Una propiedad fundamental que presentan los antioxidantes es la capacidad de formar un nuevo radical más estable a través de la adición de enlaces de hidrógeno **(13)**. Así, los antioxidantes son compuestos que pueden impedir o retardar la oxidación de los lípidos u otras moléculas por inhibición de los procesos oxidativos **(14)**. Estos se clasifican en dos grandes grupos, los antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos **(13)**. (Figura 7)

Los antioxidantes enzimáticos se dividen a su vez en defensas enzimáticas primarias y secundarias. Así, las defensas primarias están compuestas por tres enzimas importantes que impiden la formación o neutralizan los radicales libres, tales como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa. Si bien, las defensas secundarias constituidas por la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa no neutralizan directamente los radicales libres, sino que actúan como soporte a las defensas primarias **(13)**.

Con respecto a los antioxidantes no enzimáticos, existen una gran variedad de ellos como son las vitaminas (A, C, E), cofactores (Q10), compuestos nitrogenados (ácido úrico) y péptidos (glutatión) **(13)**.

Las vitaminas son un grupo de sustancias orgánicas con una gran variedad de estructuras, sin valor energético propio, y que son necesarias en pequeñas cantidades para el organismo. Éste es incapaz de sintetizarlas por sí mismo, y por ello debe obtenerlas a través de la dieta. Las vitaminas se clasifican en liposolubles (A, E, K, D), las cuales tienen un papel bioquímico limitado a reacciones específicas, y las hidrosolubles tales como la vitamina C y las del complejo B, las cuales actúan en el metabolismo energético como coenzimas **(15)**.

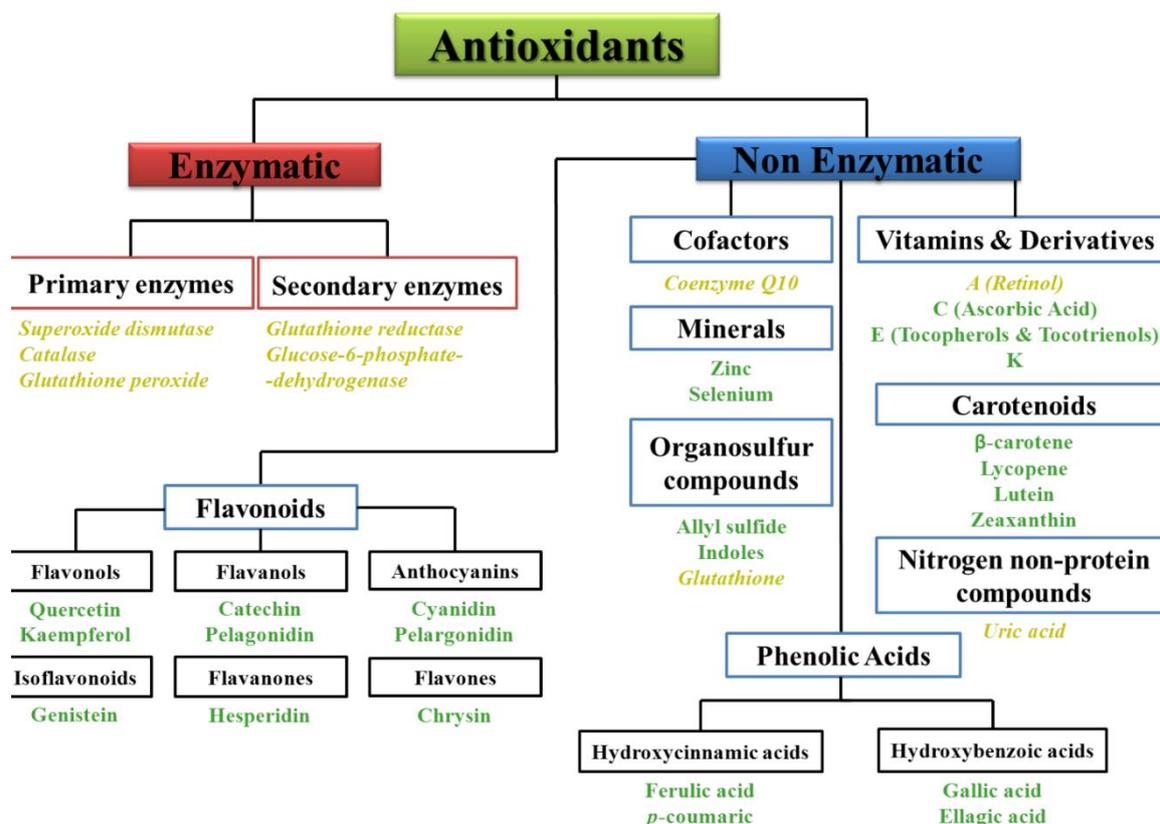


Fig. 7 Clasificación de los antioxidantes naturales. (Carocho & Ferreira, 2013)

Para el correcto funcionamiento de los procesos orgánicos y la salud del organismo, éste debe presentar un equilibrio entre los niveles de agentes prooxidantes y antioxidantes (equilibrio redox) (16). Entre los factores que pueden afectar a este balance en la leche de mamíferos está el número de gestaciones, ya que estudios previos han observado cambios en la concentración de antioxidantes en función de si se trata de madres primíparas o múltíparas, aunque esta diferencia sea poco significativa. Asimismo, el riesgo de estrés oxidativo es especialmente alto en neonatos y bebés prematuros, debido a la inmadurez de su sistema de defensa y la exposición de sus pulmones en temprano desarrollo a elevadas concentraciones de oxígeno (17).

Respecto a la composición antioxidante de la leche materna, ésta contiene una gran variedad de antioxidantes enzimáticos como la catalasa (CAT), la peroxidasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), y antioxidantes no enzimáticos incluyendo las vitaminas A, C y E, Coenzima Q10, proteínas y enzimas y minerales (17).

Antioxidantes enzimáticos de la leche materna

Catalasa (CAT)

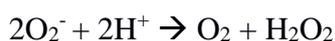
La catalasa es una enzima que se caracteriza por contener un grupo hemo ampliamente distribuido por muchos sistemas biológicos. Esta cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua.



Su concentración decrece a medida que transcurre el periodo de lactancia **(8)**.

Peróxido dismutasa (SOD)

En la leche materna se han identificado dos tipos de peróxido dismutasa, Mn-superoxido dismutasa y Cu/Zn-superóxido dismutasa las cuales catalizan la conversión del anión superóxido (O₂⁻) en peróxido de hidrógeno (H₂O₂).



El contenido de SOD es de 2.0 a 2.3 veces más alta en la leche humana en comparación con la leche bovina. Y su actividad es más alta en el calostro humano que en la leche madura **(18, 19)**. Si bien, se ha observado que la cantidad de Cu/Zn-superóxido dismutasa decrece a lo largo de la lactancia **(18)**.

Glutathion peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidasa es una enzima que contiene selenio como componente esencial. Esta enzima tiene un efecto protector contra el daño oxidativo actuando durante el periodo de lactancia, aunque algunos estudios han corroborado una disminución de su actividad conforme progresa el tiempo de lactación. La GPx cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y los hidroperóxidos orgánicos (L-OOH) usando glutatión reducido (GSH) en base a la siguiente reacción **(8)**:



O



La leche materna se caracteriza por presentar un bajo nivel de GPx. Y aunque, su función aún no se conoce por completo en la leche, es la única enzima conocida que fija el 30% del selenio total (19).

Antioxidantes no enzimáticos de la leche materna

Vitamina A

Se trata de un compuesto liposoluble, que actúa contra especies ROS. Los carotenos como los β - y α -carotenos son moléculas estructuralmente semejantes a la vitamina A, son provitaminas. Son capaces de neutralizar al oxígeno singlete (estado excitado del oxígeno molecular generado fotoquímicamente o químicamente) y a puentes disulfuros (formados por la oxidación de los radicales tiol de las proteínas, dando lugar a una molécula altamente reactiva con el oxígeno) y combinarse y estabilizar radicales peroxilo, protegiendo de este modo a las células del daño oxidativo. Además, la vitamina A es capaz de inhibir la actividad de las enzimas implicadas en la propagación de la peroxidación de los lípidos, así como prevenir los trastornos oxidativos de la glicosilación de las proteínas localizadas en la membrana celular (8).

A nivel alimentario, la vitamina A muestra una transferencia transplacentaria limitada, existiendo una baja reserva de esta vitamina en los recién nacidos dependiendo, por tanto, de la ingesta de leche materna. De acuerdo con Tijerina-Sáenz et al. (2009) (20), la concentración de vitamina A no parece contribuir a la capacidad antioxidante de la leche materna en el primer mes de lactancia, sino ser el vehículo de transmisión de ésta al lactante. Sin embargo, parece estar implicada en la disminución de la incidencia de displasia broncopulmonar (insuficiencia respiratoria) en recién nacidos de bajo peso, pues participa en la regulación del crecimiento de muchos epitelios necesarios para el correcto desarrollo de los pulmones y la retina (21).

Por otro lado, los β -carotenos y la luteína son abundantes en las muestras de leche humana, y su contenido decrece a medida que transcurre el periodo de lactancia.

Vitamina E

La vitamina E se agrupa en dos tipos: los tocoferoles (α , β , γ o δ) y los tocotrienoles (α , β , γ o δ). Todos los isómeros presentan un anillo de cromanol con un

grupo hidroxilo, que puede donar un átomo de hidrógeno para reducir los radicales libres, y una cadena lateral hidrofóbica que permite su penetración en las membranas biológicas (19). (Figura 8)

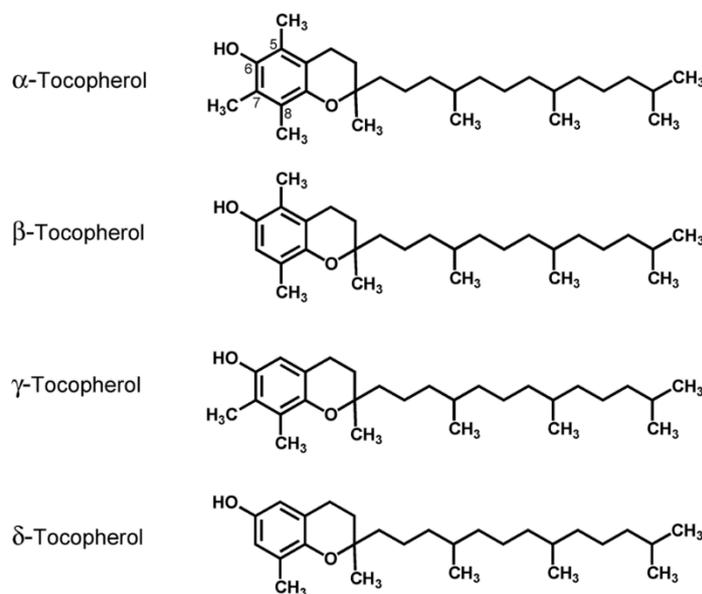


Fig. 8 Estructura de los tocoferoles.

El α -tocoferol presenta un elevado poder antioxidante convirtiéndolo en la principal vitamina liposoluble responsable de la protección de las membranas celulares contra la peroxidación. Éste se acumula en las lipoproteínas circulantes, membranas celulares y los depósitos de grasas, protegiendo a los PUFA y las lipoproteínas del estrés oxidativo, y por lo tanto, del envejecimiento (8). Sin embargo, estos son sensibles a la luz, el oxígeno y la temperatura, características que pueden afectar a su capacidad antioxidante en condiciones de almacenamiento (22).

La vitamina E es capaz de regenerar a los β -carotenos y protege a la vitamina A contra la oxidación. Esta vitamina es importante desde la concepción hasta el desarrollo postnatal. Al igual que la vitamina A, la transferencia transplacentaria de la vitamina E es limitada, siendo la leche materna la única fuente de este nutriente para los recién nacidos (8).

Si bien se demuestra que el contenido de vitamina E es mayor en la leche materna respecto a las leches de fórmulas (23), se señala el calostro como el tipo de leche que presenta una concentración más alta de α -tocoferol en comparación con la leche de transición y madura (24). Lima et al. (2014) (25) relacionan esta reducción con

la disminución de algunos de los componentes del glóbulo de grasa, siendo la vitamina E uno de los constituyentes de la membrana de estos glóbulos.

La cantidad de vitamina E está en estrecha relación con la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que tiene la leche, ya que su función es meramente proteger a los dobles enlaces de la oxidación. Por eso las leches de fórmula son enriquecidas con tocoferoles, incrementando el contenido de esta vitamina, previniendo la peroxidación de los lípidos durante la fabricación y el almacenamiento, prolongando la vida útil del producto (26).

La vitamina E, y en particular el α -tocoferol, parece tener una alta responsabilidad en la capacidad antioxidante de la leche humana al mes después del parto. Asimismo, los niveles de esta vitamina en la leche materna parecen estar influenciados por la edad de la madre, su estado nutricional del α -tocoferol, la edad gestacional (duración del embarazo) y la suplementación, pero no por el estado nutricional antropométrico, el nivel socioeconómico o la paridad (número de partos) (8).

Vitamina C

La vitamina C (ácido ascórbico) es un nutriente necesario en la realización de numerosas funciones biológicas. En los seres humanos y primates se ha perdido la capacidad de síntesis de esta vitamina siendo necesaria su ingesta a través de la dieta, para evitar su deficiencia y mantener un estado saludable (27).

Esta vitamina se caracteriza por presentar un alto potencial antioxidante pudiendo reaccionar con radicales y oxidantes. Esto explica su importancia en los fluidos extracelulares, contribuyendo a la disminución de la incidencia de atopia en bebés de alto riesgo (8). También es importante para la síntesis de colágeno, que se desarrolla durante el período de la infancia. Presenta diversas funciones bioquímicas, participa en el desarrollo de neurotransmisores, la síntesis de carnitina y mejora la absorción del hierro (19).

Si bien el ácido ascórbico se oxida rápidamente con el pH de la leche, la velocidad de oxidación está influenciada por factores como son la temperatura, la luz, la concentración de oxígeno y la presencia de oligoelementos catalíticos. La leche madura y el calostro contienen alrededor de 40 a 70 mg/l de ácidos ascórbico respectivamente (19).

Coenzima Q10

La coenzima Q10 o ubiquinona es esencial en la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial, ayudando a estabilizar las membranas celulares. Esta se adquiere tanto por biosíntesis endógena como por ingesta dietética, siendo abundante en carnes rojas y aves. La biosíntesis endógena requiere de la presencia de coenzimas (ATP) y cofactores (magnesio) en las diferentes reacciones enzimáticas que conduce a la formación de ubiquinona a partir de coenzimas esenciales (vitaminas hidrosolubles) y acetil-CoA (28). La concentración de coenzima Q10 se correlaciona con su capacidad antioxidante en la leche materna. Así, Matos et al. (2015) (8) observan una baja concentración de este antioxidante en la leche de madres con bebés prematuros presentando, por tanto, una menor capacidad antioxidante. Además, se ha observado que hay un aumento en los niveles sanguíneos de coenzima Q10 en lactantes amamantados en comparación con los lactantes alimentados con leche de fórmula durante los primeros días de vida.

Lactoferrina

La lactoferrina es una proteína de unión al hierro, que además de tener funciones antimicrobianas e inmunotróficas, tiene propiedades antioxidantes en la leche materna. Se estructura en una sola cadena polipeptídica que se pliega en dos lóbulos homólogos (N y C), con un sitio de unión al Fe^{3+} en cada lóbulo. Esta capacidad para unirse al hierro es su principal mecanismo de acción antimicrobiano, puesto que el hierro férrico es importante para el crecimiento de las bacterias. Además, juega un papel muy importante en la modulación de las reacciones redox, encontrándose en elevadas concentraciones en el suero de la leche materna.

El hierro presente en la leche materna está enlazado a la lactoferrina la cual es resistente a la degradación proteolítica del tracto gastrointestinal. Permitiendo, por tanto, una mejor absorción del hierro de la leche por los neonatos. Además, el poder antioxidante de esta proteína se debe a dicha capacidad para captar el Fe^{3+} libre, bloqueando por tanto la reacción de Fenton implicada en la producción de radicales hidroxilo altamente tóxicos (8).

La reacción Fenton fue descrita por primera vez por H.J.H. Fenton (1894) y se considera la oxidación de sustratos orgánicos mediante Fe^{2+} y H_2O_2 . En esta reacción el Fe^{2+} se oxida con H_2O_2 a Fe^{3+} , formando un radical hidroxilo y un ion hidróxido. El

Fe³⁺ se reduce de nuevo a Fe²⁺ mediante otra molécula de peróxido de hidrógeno, formándose un radical peróxido y un protón. El efecto neto es una desproporción del peróxido de hidrógeno para crear dos especies diferentes de oxígeno reactivo con agua como subproducto (29). (Figura 9)

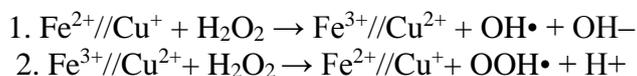


Fig. 9 Reacción de Fenton. (Ghia, 2017)

Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (ferro-O₂-oxidoreductasa, EC 1.16.3.1, hCp) es una proteína que pertenece a la familia de multicopper oxidasas (MCOs) y constituye el 95% del cobre del plasma humano. Se piensa que la hCp presenta un papel importante en el metabolismo del hierro y la homeostasis, puesto que permite la incorporación del Fe³⁺ en la apo-transferrina (30).

Se ha descrito que, la ceruloplasmina tiene propiedades antioxidantes gracias a una serie de propiedades enzimáticas, como puede ser la actividad ferroxidasa (que permite inhibir la formación de radicales hidroxilo en la reacción de Fenton y la peroxidación lipídica estimulada por el hierro) (31). Dicha actividad ferroxidasa aumenta con la formación de un complejo con la lactoferrina (8).

Estas propiedades hacen a la ceruloplasmina un antioxidante eficaz, capaz de prevenir el daño oxidativo de las proteínas, el ADN y los lípidos a través de la descomposición de peróxidos lipídicos o mediante la eliminación de radicales superóxido, hidroxilo y H₂O₂ de una manera estequiométrica.

Se ha descrito que la ceruloplasmina es mucho más efectiva como depurador de radicales peroxilo que la superóxido dismutasa, pero ligeramente menos efectiva que la catalasa (8).

Minerales

El sistema antioxidante puede involucrar también elementos traza, como hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn) y selenio (Se), elementos que existen en pequeñas concentraciones pero que exhiben potenciales redox que ejercen sus efectos

antioxidantes. El Fe es importante para la actividad de la catalasa, el Cu y el Zn son cofactores en la expresión de la superóxido dismutasa de Cu / Zn, y el Se es un componente esencial de la glutatión peroxidasa (Oshiro et al., 2001) **(32)**.

EFEECTO DEL ALMACENAMIENTO DE LA LECHE EN SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

A pesar del interés unánime en prolongar la lactancia materna, existen diversas causas que conllevan a un abandono temprano de esta como es la incorporación de la madre a la vida laboral. En estos casos la extracción de leche y su almacenamiento en el hogar permite el seguimiento de la lactancia en ausencia de la madre. Asimismo, esta práctica se emplea en los sistemas hospitalarios para la alimentación de lactantes ingresados en UCI (Unidades de Cuidado Intensivo) con leche de madres donantes, que son almacenadas en los Bancos de Leche **(33)**.

Desde 1909, la utilización de bancos de leche se ha extendido por todo el mundo, incluyendo algunos lugares de España. En estos bancos la leche de la mujer donante debe ser recolectada, procesada y almacenada de manera que se garantice la seguridad microbiológica y la calidad nutricional. Siendo importante el paso de pasteurización para inactivar microorganismos patógenos **(34)**.

La pasteurización de Holder es ampliamente utilizada en los bancos de leche materna y consiste en calentar la leche a 62,5°C durante 30 minutos, y luego enfriar la muestra rápidamente durante 20 minutos sumergiéndola en agua fría **(35)**. Se ha descrito que ésta puede producir la pérdida de componentes bioactivos, describiéndose reducciones significativas en los niveles de sIgA, lisozima, lipasa estimulada por sales biliares, citocinas, lipasas, TGF- β y adiponectina, entre otras proteínas **(36)**. Por ello, actualmente se están investigando alternativas que pudieran alterar en menor grado la composición de la leche materna, como puede ser la pasteurización a elevada temperatura durante corto tiempo, High Temperature Short Time (HTST).

Además, el contenedor de almacenamiento, la temperatura de almacén y los procesos de calentamiento pueden influenciar en los componentes nutricionales de la leche humana **(37)**. Por lo tanto, es importante cuidar las condiciones y el periodo de almacenamiento con el fin de preservar las cualidades de la leche.

El poder antioxidante de la leche se evalúa por medio de diferentes parámetros como son la capacidad antioxidante total (contenidos y actividades) y la concentración de MDA, entre otros. Asimismo, diversos estudios han observado una disminución del pH de forma creciente desde el inicio del almacenamiento, mientras que la capacidad antioxidante permanece estable durante las primeras 24 horas. En cuanto a la relación entre el pH y la capacidad antioxidante total (CAT) en la leche humana, no se ha observado una relación significativa, pero el descenso del pH si se relaciona inversamente con la concentración de MDA (33).

Protocolos de almacenamiento.

Temperatura ambiente.

La leche extraída de las madres puede ser almacenada de forma segura a temperatura ambiente (10–29°C) durante 3-4 horas, pero el tiempo de almacenamiento varía según la limpieza y la temperatura durante la extracción (38).

En cuanto a la capacidad antioxidante de la leche almacenada a temperatura ambiente, se ha observado un descenso significativo en la concentración de la glutatión a las 2 horas de la extracción. Además, Miranda et al. (2004) observan que las muestras frescas de leche presentan una concentración más baja de MDA que las almacenadas por refrigeración o congelación (39), lo cual indica un menor grado de oxidación lipídica en el primero de los casos comparativamente.

Refrigeración

La leche humana puede ser refrigerada a 4°C entre 24-72 horas, con la posible modificación de su capacidad antioxidante, existiendo resultados diversos atendiendo a la bibliografía consultada.

De este modo, se ha visto que el aumento de la acidez consecuencia de la refrigeración, tiene su origen en el incremento de ácidos grasos libres que desencadena la actividad de las enzimas lipasas, activas a bajas temperaturas, presentes en la leche materna (40). En este sentido, Bertino et al. (2013) (40) si bien observan que se produce una lipólisis tras una refrigeración durante 96 horas, el perfil de ácidos grasos de la leche materna se ve inalterado, existiendo un balance entre la concentración de

ácidos grasos saturados e insaturados. A su vez, indican que la refrigeración prolongada no modifica la capacidad antioxidante de la leche, encontrando valores constantes de marcadores oxidativos como el MDA tras 96 horas de almacenamiento, entre otros. **(40)**.

Sin embargo, Aksu et al. (2014) han descrito una disminución del 50% de la CAT en refrigeración durante 72 horas, así como Gormaz (2015) **(41)** observa un aumento del MDA a partir de las 36 horas, por lo que recomienda la congelación de las muestras antes de las 36 horas.

Por otra parte, se ha evaluado la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en muestras de leche materna refrigeradas durante 48 horas, observando un descenso en su actividad enzimática, lo que conduce a una disminución de su capacidad antioxidante. A su vez, Miranda et al. (2004) **(39)** encuentran un aumento en la peroxidación lipídica en muestras de leche almacenada a 4°C durante 4 días. Demostrando que el 4-hidroxinonenal (HNE), producto de la peroxidación, ejerce un efecto inhibitorio sobre GPx favoreciendo la disminución de su actividad en la leche almacenada.

Por otro lado, se ha observado la disminución de la vitamina C en muestras de leche almacenadas a 4°C partir de 6 horas, aconsejando, por tanto, no superar las 3 horas de refrigeración con el fin de evitar la pérdida de vitamina C **(42)**. Mientras que, la concentración de vitamina E se ve afectada a partir de las 24 horas de refrigeración **(22)**.

Congelación

Los principios de la congelación establecen que el almacenamiento a -18°C son seguros contra la contaminación bacteriana, pero los procesos enzimáticos adheridos a los alimentos podrían persistir, con posibles alteraciones en la calidad de la leche humana. De este modo, las muestras de leche deben ser almacenadas en recipientes adecuados, de tal manera que se deje un espacio en la parte superior del contenedor para permitir la expansión por congelación. También, se recomienda poner la leche almacenada lejos de la puerta del frigorífico evitando los cambios de temperatura y poner etiquetas con la fecha de extracción de la leche **(43)**.

Según indica el protocolo n° 8 del ABM (The Academy of Breastfeeding Medicine) **(38)**, la leche materna congelada (~ -20°C) es segura durante al menos 6 meses. Las vitaminas A, E y B, las proteínas totales, grasas, enzimas, lactosa, zinc,

inmunoglobulinas, lisozima y lactoferrina se conservan durante el almacenamiento de la leche humana por congelación. Si bien, algunos estudios encuentran una disminución de los niveles de vitamina C después de 3 meses de congelación **(42)**.

Estudios previos demuestran que la oxidación de los lípidos ocurre de una forma más débil en muestras congeladas que refrigeradas, pero lo suficiente como para disminuir la capacidad antioxidante de la leche. **(34, 39)**. En este sentido, Aksu et al. (2014) **(41)** describen una disminución de la CAT hasta un 50% a una temperatura de congelación de -20°C después de 72 horas. Este método de almacenamiento también muestra una ligera disminución en la actividad de la GPx, la cual es inhibida por la acción del HNE, pero en menor medida en comparación con el almacenamiento por refrigeración **(39)**. Si bien, el almacenamiento de la leche a -80°C parece preservar mejor la capacidad antioxidante **(41)**

Respecto a las variaciones que pueden sufrir las vitaminas E y C en congelación (-20°C), si bien la concentración de vitamina E se mantiene estable hasta 12 meses, la vitamina C comienza a sufrir procesos de degradación después de los 5 meses de almacenamiento. **(42)**

Recientemente, como alternativa a la congelación se propone la liofilización o deshidrocongelación. Proceso mediante el cual se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, preservando de este modo la estructura molecular de la sustancia liofilizada. Así, esta técnica previene el crecimiento bacteriano y retrasa la oxidación grasa. Y, si bien es un procedimiento poco factible para uso doméstico, puede ser una buena alternativa a la congelación, reduciendo el espacio de almacenamiento y facilitando el transporte en los bancos de leche humana **(36)**.

En resumen, los resultados actuales indican que la extracción y el almacenamiento de la leche materna pueden disminuir su capacidad antioxidante, lo que podría alterar su calidad. La producción de sustancias tóxicas como MDA o HNE, como resultado de la peroxidación lipídica, pueden conducir a un deterioro del sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, de acuerdo con los resultados presentados, el almacenamiento bajo congelación a -20°C parece ser mejor opción, en comparación con la refrigeración, para preservar la calidad de la leche materna.

CONCLUSIONES.

1. Las condiciones de asepsia durante la extracción de la leche humana condiciona las horas de su almacenamiento a temperatura ambiente. Cuanto menor sea el contenido microbiano en la leche, mayor podrá ser su periodo de almacenamiento.
2. Existe una relación inversa entre el pH y los niveles MDA (producto de la peroxidación lipídica) de la leche materna.
3. El almacenamiento de la leche bajo refrigeración durante 72 horas da lugar a una disminución de hasta un 50% de su capacidad antioxidante total (CAT), y un aumento de la concentración de MDA a partir de las 36 horas del almacenamiento.
4. En comparación con la congelación, la refrigeración de la leche materna produce una mayor inhibición de la actividad de la GPx por la acción del HNE, un producto de la peroxidación lipídica.
5. La concentración de vitamina C de la leche materna se mantiene más estable cuando se someten las muestras a congelación que cuando son mantenidas en refrigeración, 5 meses y 6 horas respectivamente.
6. Los niveles de vitamina E se mantienen invariables durante un mayor período de tiempo durante la congelación, viéndose afectada a partir de de los 12 meses, en comparación con la leche refrigerada la cual es estable hasta 24 horas.
7. A pesar de considerarse la congelación el método más efectivo de almacenamiento, también se puede producir la oxidación de los lípidos, aunque más lentamente que durante la refrigeración. Disminuyendo, por tanto, la CAT e incrementando la concentración de MDA y ácidos grasos libres.
8. Aunque la leche humana no está diseñada para su almacenamiento prolongado, produciéndose la alteración de sus propiedades a lo largo de este periodo, es posible el empleo de alternativas que minimicen los riesgos de preservar su integridad.

CONCLUSIONS

1. The conditions of asepsis during human milk extraction determine the hours of storage at room temperature. Under lower microbial content, the storage period can be prolonged.
2. There is an inverse relationship between the pH and MDA level (lipid peroxidation product) of human milk.
3. Prolonged refrigeration of human milk during 72 hours produces a 50% decrease of its total antioxidant capacity, and an increase of MDA concentration after 36 hours of storage.
4. In comparison with freezing, human milk refrigeration produces a major inhibition of GPx activity by the action of HNE, a lipid peroxidation product.
5. Human milk vitamin C concentration is more stable under freezing conditions than refrigeration storage, 6 hours and 5 months respectively.
6. Human milk vitamin E levels remains stable for a longer period during freezing storage, being affected after 12 months, in comparison with human milk refrigerated which is stable up to 24 hours.
7. Despite the fact that human milk freezing is considered the most effective storage method, a lower lipid peroxidation is possible compared to refrigeration storage. So, a decrease of human milk CAT and an increase of MDA concentration and free fatty acid levels are also possible.
8. Although human milk is not designed for being storage, due to the possible alteration of its properties throughout this period, it is plausible to use other alternatives to minimize the degradation of its antioxidant and nutritional components.

BIBLIOGRAFÍA.

- (1) **Lozano, M.J.** 2004. Lactancia Materna. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP. p. 279-286.
- (2) **Macías, S.M., Rodríguez, S., Ronayne, P.A.** 2006. Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. Archivos Argentinos de Pediatría. Vol. 104, No. 5, p. 423-430.
- (3) **Shellhorn, C. Valdés, V.** 1995. La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. Extraído y adaptado del Manuel de Lactancia para profesionales de la salud. Comisión de Lactancia MINSAL, UNICEF. Chile.
- (4) **Ballard, O., y Morrow, A.** (2014). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am* 60(1), 1-24.
- (5) **Rodríguez, C., Lorenzo, A. y Martín, V.** 2009. Nutrición lipídica, p. 153-275. En: La nutrición y alimentación en piscicultura. Fundación observatorio español de acuicultura consejo superior de investigaciones científicas ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. Madrid.
- (6) **Arbex, A.K., Bizarro, V.R., Santos, J.C.S., Araújo, L.M.M., de Jesus, A.L.C., et al.** 2015. The Impact of the Essential Fatty Acids (EFA) in Human Health. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, 5, 98-104 104.
- (7) **Ayala, A., Muñoz, F. y Argüelles, S.** 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, Article ID 360438, 31 pages.
- (8) **Matos, C., Ribeiro, M. y Guerra, A.** 2015. Breastfeeding: Antioxidative properties of breast milk. *Journal of Applied Biomedicine*, Vol. 13, Issue 3, p. 169-180.
- (9) **Carrero, I. y Herráez, A.** Biomodel. Obtenido en: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/enranciamiento.htm>
- (10) **Moreno-Rojas, R.** 2000. Nutrición y dietética para tecnólogos de alimentos, Vol. 1, p. 308. Ediciones Díaz de Santos.
- (11) **González-Córdova, A.F. y Vallejo-Córdoba, B.** 2003. Detection and Prediction of Hydrolytic Rancidity in Milk by Multiple Regression Analysis of Short-Chain Free Fatty Acids Determined by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography and Quantitative Flavor Intensity Assessment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 7127-7131
- (12) **Casper C, Hascoet J-M, Ertl T, Gadzinowski JS, Carnielli V, et al.** (2016) Recombinant Bile Salt-Stimulated Lipase in Preterm Infant Feeding: A Randomized Phase 3 Study. *PLoS ONE* 11(5): e0156071.
- (13) **Carocho, M., Ferreira, I.** 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- (14) **Isaza, Y.L., Restrepo, D. y López, J.H.** 2013. *Journal of Engineering and Technology*. Vol. 2, No. 2. ISSN: 2256-3903.
- (15) **Entrala, A.** 1995. Vitaminas. Aspectos prácticos en medicina. Vol. 1, p. 140, 1º Edición. Ediciones Díaz de Santos

- (16) **Cámara, R.L., Cámara, R., Valdés, O.** (2017). Ozonoterapia. LibrosEnRed, 2017.
- (17) **Castillo-Castañeda, P.C., Gaxiola-Robles, R., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T.** 2014. Defensas antioxidantes en leche materna en relación al número de gestas y a la edad de las madres. *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 30, No. 3, p. 540-547.
- (18) **Savić D, Vojinović J, Zvezdanović L, Cosić V, Savić V.** (2005). Importance of breastfeeding in antioxidant defence. *Srparhceloklek*, 2: 108-12.
- (19) **Živković, J., Sunarić, S., Trutić, N., Denić, M., Kocić, G., & Jovanović, T.** (2015). Antioxidants and Antioxidant Capacity of Human Milk, *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 32(2), 115-125. doi: <https://doi.org/10.1515/afmnai-2015-0012>
- (20) **Tijerina-Sáenz, A., Innis, S.M., Kitts, D.D.,** (2009). Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. *Acta Paediatr.* 98, 1793–1798.
- (21) **Uberos, J.** (2013). Vitamina A y displasia broncopulmonar en recién nacidos de muy bajo peso al nacer. *Bol.SPAO (Sociedad de Pediatría de Andalucía Oriental)* 2013; 8 (1-2)
- (22) **Lacomba, R., Cilla, A., Alegría, A., Barberá, R., Silvestre, D. et al.** 2012. Stability of fatty acids and tocopherols during cold storage of Human Milk. *International Dairy Journal* 27 (1), p. 22-26.
- (23) **Stimming, M., Mesch, C.M., Kersting, M., Kalhoff, H., Demmelmair, H., et al.** (2014). Vitamin E content and estimated need in German infant and follow-on formulas with and without long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) enrichment. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10153–10161.
- (24) **Szlagatys-Sidorkiewicz, A., Zagierski, M., Jankowska, A., Łuczak, G., Macur, K., et al.** (2012). Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. *Early Hum. Dev.* 88, 421–424.
- (25) **Lima, M.S.R., Dimenstein, R., Ribeiro, K.D.S.,** (2014). Vitamin E concentration in human milk and associated factors: a literature review. *J. Pediatr. (Rio J.)* 90, 440–448.
- (26) **Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P.C., Weber, P., y Eggersdorfer, M.** (2017). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA, (2015), 1113-1122. **Morais, S., Mourente, G., Martínez, A., Gras, N., & Tocher, D. R.** (2015). Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and $\Delta 4$ -desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(5), 588-597.
- (27) **Maret, G., Traber, J.F.S.** (2001). Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, p. 1000–1013.
- (28) **Artuch, R., Colomé, C., Villaseca, M^a.A., Pineda, M. y Campistol, J.** (1999). Ubiquinona: metabolismo y funciones. Deficiencia de ubiquinona y su implicación en las encefalomiopatías mitocondriales. Tratamiento con ubiquinone. *Revista de neurología*, 29, (1): 59-63
- (29) **Ghia, C y Ceolin, V.** (2014). The Fenton Reaction: prooxydant role of vitamin C.
- (30) **Sabatucci, A., Vachette, P., Vasilyev, V.B., Beltramini, M., Sokolov, A., et al.** (2007). Structural Characterization of the Ceruloplasmin: Lactoferrin Complex in Solution. *Journal of Molecular Biology*, 371 (4), 1038-1046.

- (31) Sokolov, A.V., Zakahrova, E.T., Kostevich, V.A., Samygina, V.R., Vasilyev, V.B., (2014). Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes. *Biometals* 27,815–828.
- (32) Oshiro, M., Mimura, S., Hayakawa, M., Watanabe, K., (2001). Plasma and erythrocyte levels of trace elements and related antioxidant enzyme activities in low-birthweight infants during the early postnatal period. *Acta Paediatr.* 90, 1283–1287.
- (33) Miranda, M., Gormaz, M., Romero, F.J., Silvestre, D. (2011). Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal. *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 26, No. 4, p. 722-728.
- (34) Vieira, A.A., Soares, F.V.M., Pimenta, H.P., Abranches, A.D., y Moreira, M.E.L. 2011. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Human Development*, 87 (8), 577-580.
- (35) García-Lara, N.R., Vieco, D.E, De la Cruz-Bértolo, J., Lora-Pablos, D., Velasco, N.U. et al. 2013. Effect of Holder Pasteurization and Frozen Storage on Macronutrients and Energy Content of Breast Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 57, Issue 3, p. 377-382.
- (36) Efecto de la conservación de la leche humana. *Acta Pediátrica España*, p. 239-243
- (37) Chan, Y.-C., Chen, C.-H. y Lin, M.-C. 2012. The Macronutrients in Human Milk Change after Storage in Various Containers. *Pediatrics & Neonatology*, 53(3), 205-209.
- (38) Bunik, M., Chantry, C.J., Howard, C.R., Lawrence, R.A., Marinelli, K.A., et al. 2010. ABM Clinical Protocol #8: Human Milk Storage Information for Home Use for Full-Term Infants. *Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee*, 5(3):127-30.
- (39) Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Jareño, E., Bosch-Morella, F. et al. 2004. Oxidative Status of Human Milk and Its Variations During Cold Storage. *BioFactors*, Vol. 20, No. 3, p. 129-137.
- (40) Bertino, E., Giribaldi, M., Baro, C., Giancotti, V., Pazzi, M., et al. (2013) Effect of Prolonged Refrigeration on the Lipid Profile, Lipase Activity, and Oxidative Status of Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Volume 56, Issue 4, p 390–396.
- (41) Gormaz, M.J. (2015). Análisis del contenido de Macronutrientes y de las Capacidades Antioxidantes y Bactericida de la Leche Humana para la alimentación de recién nacidos prematuros (Tesis doctoral). Universidad Miguel Hernández, Alicante, Valencia.
- (42) Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. (2007). Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chemistry* 106 (2008) 65–70
- (43) Chang, J.-C., Chen, C.-H., Colmillo, L.-J., Tsai, C.-R., Chang, Y.-C et al. 2013. Influencia del Proceso Prolongado de Almacenamiento, Pasteurización, y el Tratamiento Térmico de Proteínas Biológicamente Activas de Leche Humana. *Pediatría y Neonatología*, 54, Issue 6, p. 360-366.