

EFEITOS DE TRATAMENTOS E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NA ESTABILIDADE DE ÁCIDOS GRAXOS E CITOCINAS IL-5 E IL-6 EM LEITE HUMANO MADURO AO LONGO DE 180 DIAS

EFFECTS OF PROCESSING TREATMENTS AND STORAGE CONDITIONS ON THE STABILITY OF FATTY ACIDS AND IL-5 AND IL-6 CYTOKINES IN MATURE HUMAN MILK DURING 180 DAYS OF STORAGE

Gislaine de Almeida Santana Ientz¹

Eloize Silva Alves²

Cristiane Renata Silva³

Deborah Heloíse Fernandes Machado⁴

Aline Francieli da Silva Duarte⁵

Christyna Beatriz Aparecida Genovez Tavares⁶

Joana Máira Valentin Zacarias⁷

Jeane Eliete Laguila Visentainer⁸

Oscar Oliveira Santos⁹

Jesui Vergílio Visentainer¹⁰

RESUMO: Bancos de leite humano enfrentam desafios relacionados ao armazenamento e distribuição do leite humano. Este estudo avaliou a estabilidade de ácidos graxos e das interleucinas IL-5 e IL-6 utilizando cromatografia gasosa, ensaio multiplex e análise multivariada em amostras de leite humano cru (CRU), pasteurizado (PAST) e liofilizado (LIO) armazenados por até 180 dias (D). As amostras foram armazenadas em condições especificamente recomendadas, sendo CRU e PAST mantidas a -18 °C, e LIO armazenadas à temperatura ambiente (LIO₂₅) ou sob refrigeração (LIO₅). Os resultados mostraram dois grupos distintos na composição de ácidos graxos, associando D0-D30 e D60-D180. CRU e PAST apresentaram perfis semelhantes nos períodos iniciais e maiores alterações entre D60 e D180, relacionadas a reações lipolíticas decorrentes da maior suscetibilidade à atividade da lipase no estado líquido congelado, enquanto as amostras LIO diferiram devido ao estado em pó. LIO₅ destacou-se ainda com melhor preservação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) e saturados (AGSs), evidenciando que seu processamento e armazenamento minimiza reações oxidativas e hidrolíticas. IL-5 e IL-6 mostraram sensibilidade aos tratamentos, com expressão ativa apenas na CRU. A análise de componentes principais confirmou a transição dos perfis bioativos ao longo do armazenamento, associada ao equilíbrio entre biomarcadores inflamatórios. Conclui-se que a avaliação da qualidade do leite humano em condições reais é essencial para estimar a estabilidade dos compostos bioativos e garantir a qualidade nutricional e imunológica do alimento ofertado, considerando as necessidades do neonato para uma distribuição mais adequada.

1

Palavras-chave: Banco de leite humano. Tratamento. GC-FID. Multiplex. Análise multiexploratória.

¹Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

²Pós-doutoranda, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

³Doutora, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

⁵Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

⁶Doutora, Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

⁷Docente, Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

⁸Docente, Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

⁹Docente, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

¹⁰Docente, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

ABSTRACT: Human milk banks face challenges related to the storage and distribution of human milk. This study evaluated the stability of fatty acids and the interleukins IL-5 and IL-6 using gas chromatography, multiplex assay, and multivariate analysis in samples of raw (RAW), pasteurized (PAST), and freeze-dried (FD) human milk stored for up to 180 days (D). Samples were stored under specifically recommended conditions, with RAW and PAST maintained at -18°C , while FD samples were stored at room temperature (FD25) or under refrigeration (FD5). The results revealed two distinct groups in fatty acid composition, corresponding to D0–D30 and D60–D180. RAW and PAST exhibited similar profiles during the initial storage periods and greater changes between D60 and D180, likely associated with lipolytic reactions resulting from the higher susceptibility of lipase activity in the frozen liquid state. In contrast, FD samples differed due to their powdered form. FD5 showed superior preservation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and saturated fatty acids (SFAs), indicating that freeze-drying combined with refrigerated storage minimizes oxidative and hydrolytic reactions. IL-5 and IL-6 were sensitive to the applied treatments, with active expression detected only in RAW samples. Principal component analysis confirmed the transition of bioactive profiles throughout storage, associated with the balance of inflammatory biomarkers. These findings highlight the importance of evaluating human milk quality under real storage conditions to estimate the stability of bioactive compounds and ensure the nutritional and immunological quality of the milk provided, considering neonatal requirements and supporting more appropriate distribution practices.

Keywords: Human milk bank. Treatment. GC-FID. Multiplex assay. Multivariate analysis.

INTRODUÇÃO

2

O leite humano é reconhecido como o padrão-ouro da nutrição infantil, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como alimento exclusivo até os seis meses e complementar até os dois anos ou mais (WHO, 2025). Sua composição única, rica em nutrientes e compostos bioativos, confere propriedades protetoras, imunomoduladoras e anti-inflamatórias, essenciais para o desenvolvimento saudável e redução da morbidade infantil (Muxfeldt et al., 2025).

Nesse contexto, sua fração lipídica desempenha papel central na modulação da resposta imune, especialmente pelos ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), nos quais os da série n-3 estão associados a efeitos anti-inflamatórios, enquanto os n-6 tendem a respostas pró-inflamatórias (Ientz et al., 2023). Esse equilíbrio lipídico influencia diretamente a produção de citocinas, como a interleucina (IL)-5, ligada a respostas reguladoras, e a IL-6, cuja atuação é dependente do contexto fisiológico, podendo exercer funções pró- e anti-inflamatórias (Kielbasa; Gadzała-Kopciuch; Buszewski, 2021). Nesse sentido, alterações na composição de ácidos graxos podem impactar diretamente o perfil imunológico do leite humano, reforçando sua natureza dinâmica e biologicamente ativa.

Apesar dos benefícios do aleitamento materno, apenas 48% dos bebês com menos de seis meses recebem amamentação exclusiva (WHO, 2025b). Nos casos em que o leite humano da própria mãe não é disponível, os Bancos de Leite Humano suprem a demanda de recém-nascidos prematuros ou de baixo peso, oferecendo leite humano doado como alternativa superior às fórmulas infantis e outros substitutos, devido à imaturidade fisiológica e maior suscetibilidade a infecções, inflamações e complicações metabólicas (Muxfeldt et al., 2025).

Entretanto, a operacionalização desses bancos de leite humano envolve múltiplas etapas sob rigoroso controle sanitário, incluindo tratamento térmico e manutenção contínua da cadeia de frio, o que eleva custos e limita sua expansão, sobretudo em países de baixa e média renda (Alves et al., 2025). A conservação do leite humano baseia-se, majoritariamente, na refrigeração ou no congelamento, estratégias eficazes para o controle microbiológico, mas que nem sempre priorizam a preservação da integridade nutricional e bioativa, como lipídios e proteínas imunologicamente ativas (Silva et al., 2026).

Nesse contexto, a liofilização surge como uma alternativa promissora, ao produzir um leite humano em pó com maior estabilidade, maior vida útil e menor dependência da cadeia de frio, facilitando o transporte e armazenamento (Alves et al., 2025; Silva et al., 2026). Contudo, apesar dessas vantagens, a aplicação da liofilização ainda não está amplamente consolidada nos bancos de leite humano e carece de evidências científicas que sustentem sua incorporação nas diretrizes técnicas. Embora estudos prévios tenham investigado seus efeitos sobre componentes imunológicos e ácidos graxos (Alves et al., 2025; Silva et al., 2026), ainda são limitadas as abordagens integradas avaliando simultaneamente a estabilidade de ácidos graxos e citocinas sob diferentes tratamentos e condições de armazenamento prolongado.

Diante dessas lacunas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade de ácidos graxos e citocinas no leite humano maduro cru, pasteurizado e liofilizado, armazenados sob diferentes condições por até 180 dias, visando compreender os impactos do tratamento e da estocagem sobre os biomarcadores inflamatórios e a qualidade funcional do alimento.

MÉTODOS

Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo de ácidos graxos eram de grau analítico, incluindo clorofórmio, metanol, cloreto de sódio, n-heptano adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil), e hidróxido de potássio obtido da Dinâmica (São Paulo, Brasil). Para identificação e quantificação

dos ésteres metílicos de ácidos graxos, utilizaram-se como padrões o metil tricosanoato (23:0; pureza $\geq 99\%$) e a mistura padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos C₄–C₂₄ FAME Mix (pureza $\geq 97\%$), ambos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). A dosagem das citocinas foi realizada por meio de ensaio imunológico multiplex baseado em fluorescência, utilizando o kit ProcartaPlex™ Human Essential Th1/Th2 Cytokine Panel 6-plex da Thermo Fisher Scientific Inc. (Burlington, Canadá).

Amostragem

O estudo possui aprovação em comitê de ética institucional (parecer No 6.233.963/2025). Foram coletadas amostras de leite humano maduro cru, sem tratamento prévio, no Banco de Leite Humano do Hospital Universitário Regional de Maringá. Incluíram-se 31 doadoras que tiveram parto a termo (> 37 semanas). A coleta ocorreu sob cadeia de frio ($< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), conforme recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2024).

Em seguida, o teor de acidez de cada frasco individual foi determinado por titulação, utilizando-se 1 mL de amostra acrescido de 4 gotas do indicador fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic). Cada 0,1 mL de titulante consumido corresponde a 1 °D (Silva et al., 2026). Amostras com acidez $\leq 8\text{ }^{\circ}\text{D}$ foram consideradas adequadas para tratamento, conforme os padrões de qualidade estabelecidos pela Anvisa (2024). As amostras que atenderam a esse critério foram então reunidas em um único pool contendo aproximadamente 4700 mL e posteriormente subdivididas em alíquotas destinadas aos diferentes tratamentos do leite humano: cru, pasteurizado e liofilizado.

4

Tratamentos no leite humano

Leite humano cru (não tratado)

Aproximadamente 250 mL de leite humano cru (CRU) foi utilizado como controle, sem aplicação de qualquer tratamento.

Pasteurização Holder

Aproximadamente 250 mL de leite humano acondicionado em frasco de vidro foi submetido à pasteurização conforme protocolo estabelecido pela Anvisa (2024). A amostra foi aquecida a $62,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho-maria (modelo SL-152/10L, Solab Científica, Piracicaba, Brasil), com a temperatura monitorada continuamente no centro do frasco por termômetro a laser

digital (Suryha, Caxias do Sul, Brasil). O tempo de pasteurização começou a ser cronometrado assim que a temperatura alvo foi atingida. Durante o tratamento, o frasco foi agitado manualmente a cada 5 min para garantir a homogeneidade da amostra. O tratamento foi considerado concluído após 30 min, e denominado a amostra como leite humano pasteurizado (PAST).

Liofilização

Aproximadamente 4200 mL de leite humano foram destinados à liofilização (LIO). A amostra foi fracionada em 21 frascos de vidro (~200 mL cada) e previamente submetida à pasteurização, conforme a metodologia descrita anteriormente, sendo esta etapa indicada como pré-tratamento à liofilização (Anvisa, 2024). Após a pasteurização, as amostras foram transferidas para recipientes retangulares de polietileno de alta densidade, registrando-se a massa do recipiente vazio e do leite humano contido, pesada em balança semi-analítica (modelo ATY224, Shimadzu, Barueri, Brasil). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -18 °C em freezer doméstico (modelo IT70S, Electrolux, Curitiba, Paraná, Brasil) durante 24 h como etapa preparatória para a liofilização.

A liofilização foi realizada em liofilizador (modelo Lio8, LioBras, São Carlos, Brasil), operando a -52 °C e pressão de 11,2 µHg. O tratamento foi mantido até que a remoção da água por sublimação atingisse um teor de umidade final entre 4% e 5%, de acordo com o padrão estabelecido para leite humano liofilizado (Anvisa, 2024), medido em analisador infravermelho (modelo I-Thermo, Bel Engineering, Monza, Itália). Após o tratamento, as amostras secas foram pesadas para cálculo do rendimento da secagem. Em seguida, todo o material seco foi reunido em um único volume e triturado em almofariz de porcelana até a obtenção de um pó fino e homogêneo. A amostra final foi considerada leite humano liofilizado (LIO) e, devido ao seu estado sólido em pó, foi armazenada em embalagem metalizada tipo stand-up, de cor prata, selada a vácuo (modelo CPVS 290R, Cetro Máquinas, Bauru, Brasil).

Condições do armazenamento

As amostras CRU e PAST foram divididas em seis frascos de vidro individuais para cada tratamento avaliado, de acordo cronograma de análises, que envolveu armazenamento sob temperatura de congelamento a -18 °C em freezer doméstico (modelo IT70S, Electrolux, São Paulo, Curitiba, Brasil). Para a realização posterior das análises, em cada tempo de

armazenamento avaliado, essas amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 °C para garantir a homogeneidade da amostra.

O LIO foi dividido em doze alíquotas, conforme o cronograma experimental (seis períodos e duas condições de armazenamento). As amostras foram mantidas a 25 ± 2 °C (LIO₂₅) em incubadora com controle térmico (modelo SSBOD120L, Solid Steel, Piracicaba, SP, Brasil), com umidade relativa de $53 \pm 4\%$. Paralelamente, outra fração foi armazenada a 5 ± 2 °C (LIO₅), em geladeira doméstica (modelo IT70S, Electrolux, Curitiba, PR, Brasil), com umidade relativa de $48 \pm 3\%$. Temperatura e umidade foram monitoradas por termo-higrômetro digital (modelo K29-5070H, Forlab, Porto Alegre, RS, Brasil). Para as análises posteriores, o LIO foi reconstituído com água destilada morna a 37 °C, considerando a quantidade de água removida durante a secagem de modo a recuperar a composição original do leite humano in natura.

O período de avaliação do armazenamento das amostras começou imediatamente após o tratamento considerando dia (D)-o, e os demais períodos avaliados foram em D30, D60, D90 e D180. Toda a metodologia efetuada foi descrita na Figura 1.

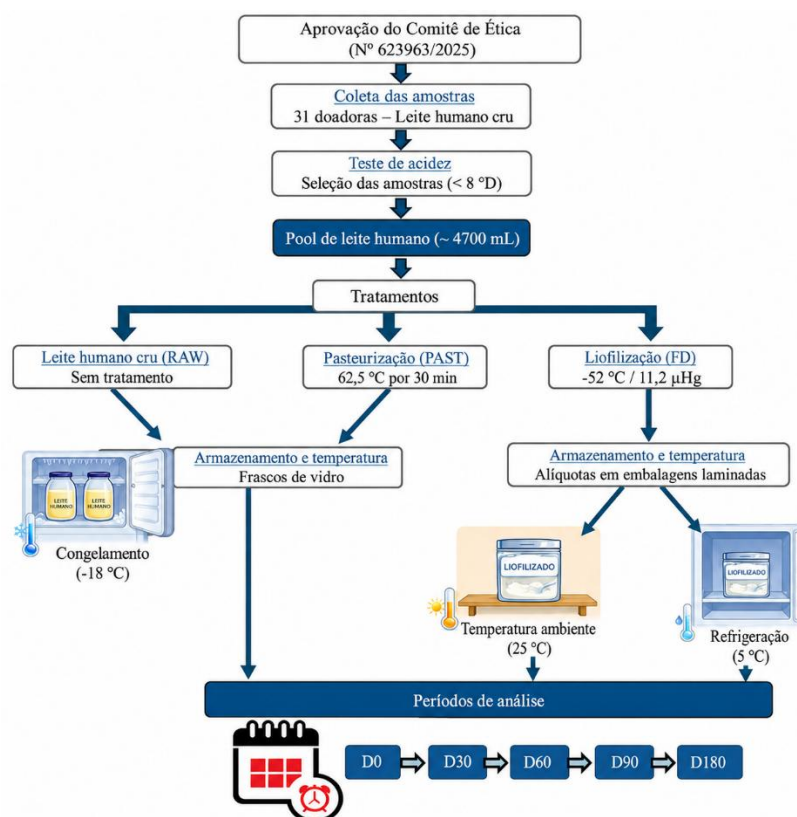


Figura 1. Mapa esquemático do preparo das amostras.

Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Os lipídios foram extraídos, esterificados e analisados de acordo método usado por Ientz et al., 2023). Aproximadamente 1 g de amostra foi pesado em tubo de centrifugação com capacidade de 50 mL. Em seguida, foi adicionada a solução extratora composta por clorofórmio:metanol (2:1, v v⁻¹), na proporção 1:20 (m v⁻¹), totalizando 20 mL, e a mistura foi homogeneizada por 3 min em agitador magnético (modelo 761-5, Fisatom, São Paulo, Brasil). Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 5 min a 6000 rpm e 25 °C em centrífuga refrigerada (modelo Harrier 18/80, Sanyo MSE, Kent, UK) para remoção das proteínas precipitadas. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifugação, ao qual foram adicionados 4 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (m v⁻¹). A mistura foi agitada por 2 min e centrifugada novamente nas mesmas condições para promover a separação das fases. A fase inferior (orgânica, contendo clorofórmio) foi coletada com pipeta Pasteur, transferida para balão volumétrico de 250 mL previamente pesado, e o solvente foi removido em evaporador rotativo (modelo 802, Fisatom, São Paulo, Brasil) a 37 °C até completa evaporação.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram obtidos por metilação dos lipídios totais. Aproximadamente 100 mg do extrato lipídico foram transferidos para tubo de centrifugação, adicionando-se 2 mL de heptano, seguido de homogeneização em vórtex (modelo

7

 VX-200, Labnet International Inc., New Jersey, EUA) por 2 min. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de potássio em metanol (2 mol L⁻¹) e 0,5 mL do padrão 23:0 (preparado a 1 mg mL⁻¹ em n-heptano). A mistura foi novamente agitada por 3 min e mantida sob refrigeração por 24 h para separação completa das fases. A fase superior, contendo os FAMES, foi coletada para análise cromatográfica.

A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização em chama (GC-FID) (modelo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, EUA), equipado com coluna capilar CP-7420 (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme, composta por cianopropil como fase estacionária) e injetor split/splitless. A injeção foi realizada com volume de 2 µL em modo split (1:40). A temperatura do injetor foi mantida a 230 °C e a do detector a 250 °C. O programa de temperatura do forno iniciou a 65 °C (4 min), com aquecimento até 185 °C à razão de 15 °C min⁻¹ (mantido por 12 min), seguido de elevação até 235 °C à razão de 20 °C min⁻¹ (mantido por 14 min). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste (1,4 mL min⁻¹), o nitrogênio como gás make-up (30 mL min⁻¹), e a chama foi alimentada com hidrogênio (30 mL min⁻¹) e ar sintético (300 mL min⁻¹).

As integrações dos picos foram realizadas utilizando o software ChromQuest™ 5.0, onde a identificação dos FAMES foi realizada por comparação dos tempos de retenção com o padrão comercial C₄-C₂₄ FAME Mix analisado nas mesmas condições cromatográficas do presente estudo, e a composição de ácidos graxos nos lipídios totais das amostras foi calculada e expressa em mg g⁻¹ de lipídios totais (Muxfeldt et al., 2025).

Dosagem de citocinas IL-5 e IL-6

As amostras correspondentes a todos os períodos experimentais foram fracionadas em alíquotas de 10 mL e armazenadas a -80 °C em ultrafreezer (modelo Biomedical MDF-U537, Sanyo MSE, Kent, UK) até a realização das análises de citocinas. Para o preparo das amostras, alíquotas de 200 µL foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min a 4 °C (modelo 5417R, Eppendorf, Alemanha) para obter a fração sérica para análise.

A quantificação simultânea das citocinas IL-5 e IL-6 foi realizada usando kit comercial ProcartaPlex™ Human Essential Th1/Th2 Cytokine Panel 6-plex (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Burlington, Canadá) em imunoensaio multiplex baseado na tecnologia Luminex® xMAP®, utilizando o sistema MAGPIX® (Luminex® xMAP® Corp., Austin, TX, EUA). Para a reação, 50 µL de cada amostra foram incubados para reação, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Os dados obtidos após análise foram processados usando o software xPONENT (versão 4.2.1324.0). Os resultados foram expressos em pg mL⁻¹ de amostra.

8

Análise dos dados

A composição de ácidos graxos foi avaliada por Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) com mapa de calor, usando distância euclidiana quadrada e método de Ward com o pacote pheatmap no software RStudio (versão 2025.05.1+513), para identificar padrões de similaridade entre as amostras. Além disso, dados de citocinas foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste tukey ($p < 0,05$) usando software Statistica 10.0. Para explorar associações multivariadas entre ácidos graxos e citocinas, foi realizada Análise de Componentes Principais (PCA) no RStudio utilizando os pacotes FactoMineR, factoextra e ggplot2, a partir dos valores médios de ambas as variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Composição de ácidos graxos

A Figura 2 apresenta o dendrograma da HCA associado ao mapa de calor, permitindo avaliar a dinâmica da composição de ácidos graxos em leite humano submetido a diferentes tratamentos e períodos de armazenamento. A intensidade da coloração reflete variações nas concentrações, enquanto o comprimento dos ramos indica o grau de similaridade entre as amostras.

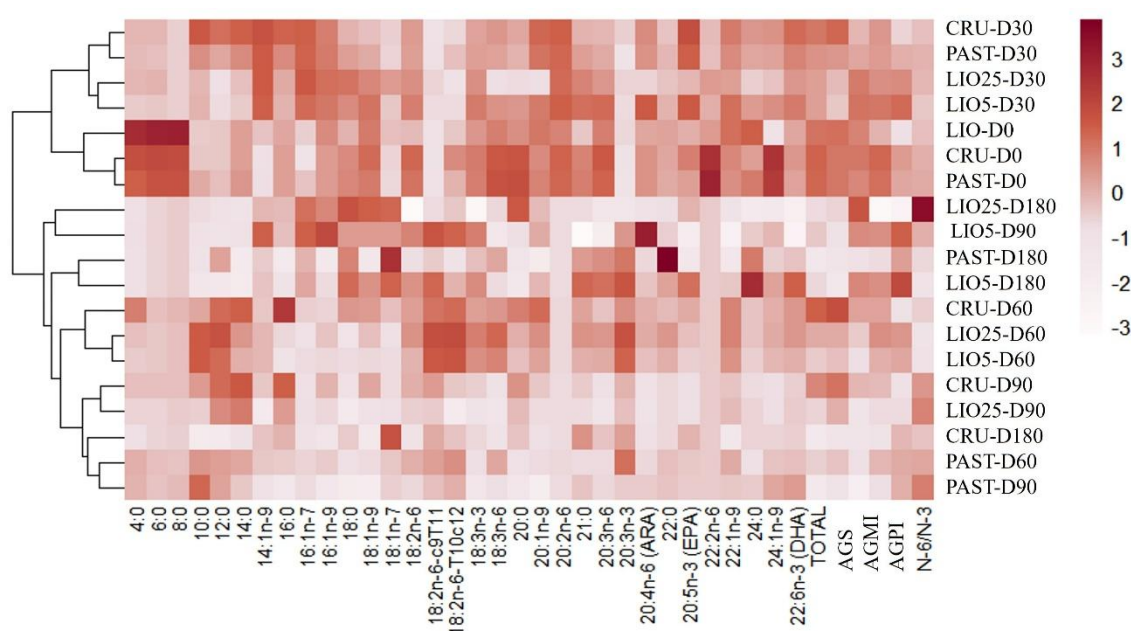


Figura 2. Mapa de calor com agrupamento hierárquico ilustrando a estabilidade da composição de ácidos graxos (mg g^{-1} de lipídio) em leite humano sob diferentes tratamentos e condições de armazenamento ao longo do tempo.

A HCA revelou dois agrupamentos principais, sendo o primeiro composto pelas amostras dos períodos D0 e D30 e o segundo englobando D60, D90, e D180, evidenciando uma reorganização progressiva dos ácidos graxos ao longo do tempo de armazenamento. Resultados semelhantes foram descritos por Ribeiro et al., (2021), que observaram manutenção do perfil de ácidos graxos até 30 dias, seguida de alterações entre 60 e 180 dias em leite humano cru e pasteurizado, descrevendo que tais mudanças podem auxiliar na definição do prazo de validade de acordo com as necessidades nutricionais neonatal.

Foi observado a formação de um cluster de baixa distância entre CRU-D0 e PAST-D0, indicando elevada similaridade, possivelmente associada à manutenção da matriz líquida em ambas. Em um nível hierárquico ligeiramente superior, a inclusão da amostra LIO-D0 no agrupamento sugere similaridade parcial. No entanto, essa maior distância relativa pode ser

explicada pelo fato de LIO-Do corresponder a uma amostra liofilizada e posteriormente reconstituída, etapa que pode não promover a completa homogeneização da matriz, resultando em diferenças residuais em relação às amostras líquidas (Cavazos-Garduño et al., 2016).

A amostra LIO-Do apresentou maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta (4:0, 6:0 e 8:0) em relação às demais. O 4:0 está associado à modulação da expressão gênica e à redução de processos inflamatórios intestinais, enquanto 6:0 e 8:0 apresentam atividade antimicrobiana (Ientz et al., 2023; Muxfeldt et al., 2025). Por outro lado, CRU-Do e PAST-Do exibiram perfis semelhantes, com maiores concentrações de 24:1n-9 e 22:2n-6. Essas diferenças sugerem que o processo completo da liofilização promove alterações estruturais na membrana do glóbulo de gordura (MFGM), uma vez que etapas como congelamento e sublimação causam desestabilização interfacial e redução do tamanho dos glóbulos, aumentando a área superficial exposta e favorecendo reações oxidativas (Cavazos-Garduño et al., 2016).

Após 30 dias, CRU-D30 e PAST-D30 permaneceram agrupados, indicando a manutenção da similaridade da matriz líquida congelada, agora caracterizada por maior teor de ácidos graxos saturados (AGSs), especialmente 10:0, 12:0, 14:0 e 16:0, em comparação à LIO25-D30. Esse comportamento pode estar relacionado à atividade residual de lipases termooestáveis e aos danos na MFGM decorrentes da formação de cristais de gelo durante o armazenamento a -18 °C (Silva et al., 2026). Além disso, a presença de água parcialmente não congelada favorece a ocorrência de reações enzimáticas e oxidativas lentas (Conboy-Stephenson et al., 2024). Por outro lado, LIO25-D30 e LIO5-D30 formaram um subcluster distinto, indicando diferenças na estabilidade da matriz em pó. Este achado corrobora com o estudo de Lozano et al., (2014), que relataram diferenças no perfil de ácidos graxos entre leite humano liofilizado e congelado, com maior estabilidade associada ao produto em pó, possivelmente devido à maior preservação dos ácidos graxos insaturados, conforme também observado na Figura 2.

Em períodos mais avançados (D60, D90 e D180), o tempo de armazenamento exerceu uma influência mais pronunciada sobre o perfil lipídico, resultando na formação de diversos subclusters. As amostras CRU-D60 e CRU-D180 se isolaram dentro deste cluster principal, indicando maior dissimilaridade, possivelmente associada a perda de gordura atribuída por adesão ao recipiente, lipólise ou peroxidação lipídica (Silva et al., 2026).

Embora o tratamento do leite humano cru seja recomendado em até 15 dias após a coleta (Anvisa, 2024), a CRU foi mantida como amostra controle para comparação da estabilidade lipídica das diferentes formas de consumo do alimento. O leite humano cru apresenta maior

atividade lipolítica durante o congelamento em comparação ao pasteurizado (De Oliveira et al., 2016). O congelamento não preserva totalmente a fração lipídica, sendo indicado favorecendo a hidrólise de triglicerídeos e aumento de ácidos graxos livres por ação de lipases residuais durante armazenamento prolongado de 2 a 5 meses em congeladores domésticos (Gao et al., 2019). Em matriz líquida, esse efeito é intensificado, justificando a separação dessas amostras no dendrograma.

O subcluster formado por PAST-D60 e PAST-D90 indica diferenças mais pronunciadas na composição de ácidos graxos em relação a períodos mais curtos de armazenamento. Borgo et al., (2015) relataram que o armazenamento de leite humano pasteurizado a -20°C por até 90 dias pode aumentar a hidrólise lipídica e reduzir o teor de triglicerídeos, resultando em perdas de gordura total. Esse comportamento é consistente com os achados do presente estudo, nos quais o teor total de ácidos graxos e suas principais frações incluindo AGSs, ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) e AGPIs, que apresentaram redução moderada entre PAST-D60 e PAST-D90, acompanhada de alterações na distribuição dos ácidos graxos individuais, com menores concentrações em comparação às demais amostras.

O agrupamento entre LIO25-D60 e LIO5-D60 reforça a influência predominante da matriz liofilizada, que manteve perfis semelhantes para a maioria dos ácidos graxos. A similaridade observada pode estar associada a redução da atividade de água, que inibe o crescimento microbiano e atenua reações hidrolíticas e oxidativas. Martysiak-Żurowska; Rožek; Puta (2022) indicaram que o leite humano liofilizado mantém a composição de ácidos graxos por pelo menos seis semanas, mesmo sob diferentes condições de armazenamento como refrigeração e temperatura ambiente.

A proximidade entre CRU-D90 e LIO25-D90 foi notada, destacando a relação de ácidos graxos como 16:1n-7, 18:1n-7, ARA, EPA, 22:2n-6 e 24:1n-9 entre as amostras. Contudo, a CRU-D90 exibiu concentrações totais mais elevadas de AGSs, AGMIs e AGPIs do que LIO25-D90, o que pode ser atribuído à ausência de etapas adicionais de tratamento. Essa condição também implica maior suscetibilidade à lipólise ativa, uma vez que a atividade lipolítica tende a persistir durante o armazenamento congelado. Por outro lado, alterações no perfil lipídico do LIO25-D90 podem ser atribuídas a reações de auto-oxidação, que podem ocorrer mesmo com baixa disponibilidade de oxigênio e ser aceleradas por temperatura ou radicais livres (Silva et al., 2026).

A relação entre LIO₂₅-D₁₈₀ e LIO₅-D₉₀ revelou que ambas as amostras apresentaram baixas concentrações de AGSs com ≤ 14 carbonos, 20:3n-6, 22:1n-9 e DHA, além de níveis semelhantes de 16:0. Nesse contexto, LIO₂₅-D₁₈₀ exibiu maior teor de AGMIs, impulsionado por 18:1n-7 e 18:1n-9, e menores concentrações de AGPIs em destaque 18:2n-6 e 18:3n-3, refletindo-se em menor razão AGPI/AGS e maior razão n-6/n-3. Esse padrão sugere degradação de AGPIs, mais suscetíveis à oxidação devido ao maior grau de insaturação (Islam et al., 2023), caracterizando um perfil pró-inflamatório (Ientz et al., 2023). Em contraste, LIO₅-D₉₀ preservou melhor os AGPIs (ARA, 20:3n-3, 18:2n-6 e 18:3n-3) e apresentou maior razão AGPI/AGS; embora esse índice isolado não reflita totalmente o valor nutricional, a literatura indica que ácidos graxos insaturados estão associados a respostas anti-inflamatórias, enquanto perfis ricos em AGS tendem a estimular vias pró-inflamatórias (Ientz et al., 2023). O nível de ARA, EPA e DHA identificados em LIO₅-D₉₀ corroboram com evidências de estabilidade lipídica do leite humano liofilizado por até 90 dias (Lozano et al., 2014), embora reações pode ocorrer devido a redução de tamanho de glóbulos lipídicos e aumento da suscetibilidade oxidativa (Martysiak-Żurowska; Rožek; Puta, 2022).

Na relação entre PAST-D₁₈₀ e LIO₅-D₁₈₀, a última apresentou maior conteúdo de AGMIs e AGPIs, com destaque para os maiores níveis de EPA e DHA entre as amostras em D₁₈₀. Esse perfil resultou em maior razão AGPI/AGS em LIO₅-D₁₈₀, associada a benefícios cardiometabólicos, uma vez que AGPIs contribuem para a redução do colesterol de baixa densidade lipoproteína (LDL), enquanto os AGSs tendem a elevá-lo (Ientz et al., 2023). A manutenção de AGPIs é biologicamente relevante, considerando seu papel estrutural em membranas celulares e na modulação de respostas inflamatórias, reforçando que EPA e o DHA suprimem citocinas pró-inflamatórias (Kielbasa; Gadzała-Kopciuch; Buszewski, 2021).

Por outro lado, LIO₂₅-D₁₈₀ e LIO₅-D₁₈₀ diferiram pela maior preservação de AGPIs sob refrigeração e maior proporção de AGMIs e AGSs em temperatura ambiente. Esse comportamento está associado ao efeito da temperatura como um dos fatores primários na oxidação lipídica, mesmo em embalagens a vácuo (Silva et al., 2026). Sproat; Ghosh; Alshaikh, (2024) observaram estabilidade dos ácidos graxos livres por até 4 meses a 4 °C, enquanto o armazenamento a 25 °C ou por períodos superiores a 120 dias promoveu seu acúmulo e de AGMIs, corroborando os achados deste estudo. De forma semelhante, Zhu et al., (2020) relataram aumento de ácidos graxos livres em leite liofilizado, mais pronunciado após 100 dias em temperatura ambiente. O aumento da energia térmica acelera reações radiculares,

favorecendo a formação de peróxidos e a degradação de AGPIs (Martysiak-Żurowska; Rožek; Puta, 2022). Além disso, a atividade residual de lipases contribui para a liberação de ácidos graxos, com preferência por cadeias curtas e médias (Silva et al., 2026). Isto corrobora os achados de Friend et al., (1983) que descreveram atividade residual de lipase e protease em leite humano pasteurizado e liofilizado por até seis meses a 4 °C e 25 °C.

A interpretação desses resultados é complexa, considerando a presença de diversos fatores no leite humano que podem potencialmente inibir a peroxidação lipídica, como vitaminas lipossolúveis e enzimas antioxidantes (Bomfim et al., 2018), que não foram avaliadas neste estudo. De forma semelhante, estudos têm avaliado a estabilidade lipídica do leite humano tratado (Cheema et al., 2025) visando fortalecer e ampliar a adoção da liofilização como método de rotina em bancos de leite humano. Outros pesquisadores examinaram o perfil de ácidos graxos e proteínas, mas por um período mais curto do que o deste estudo, tipicamente até 3 e 6 meses, e não encontraram nenhum impacto significativo da liofilização (Hahn et al., 2020; Lozano et al., 2014; Martysiak-Żurowska; Rožek; Puta, 2022).

Em conjunto, os resultados indicam que, mesmo após 180 dias, a liofilização apresenta uma vantagem relativa na preservação da qualidade lipídica quando comparada ao congelamento do leite humano cru ou pasteurizado. Como este estudo avaliou a estabilidade por até 180 dias, investigações futuras com períodos mais prolongados são necessárias para definir com maior precisão o limite seguro de estabilidade lipídica, especialmente em amostras liofilizadas. No entanto, o consumo do leite humano armazenado por menor tempo garante uma maior qualidade bioativa para recém-nascidos.

Citocinas (IL-5 e IL-6)

A Figura 3 apresenta as concentrações de IL-5 e IL-6 em leite humano submetido a diferentes tratamentos e períodos de armazenamento. Considerando a baixa concentração dessas citocinas na matriz, o uso de ensaios multiplex é indicado, devido à sua elevada sensibilidade e ampla faixa de detecção, permitindo quantificação confiável desses biomarcadores (Kiełbasa; Gadzała-Kopciuch; Buszewski, 2021).

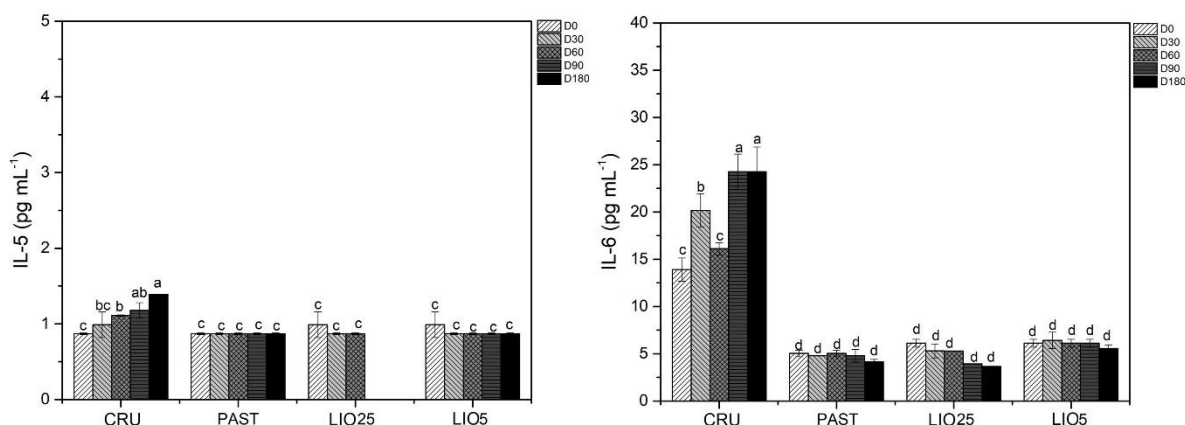


Figura 3. Estabilidade das dosagens de citocinas IL-5 e IL-6 (pg mL⁻¹) no leite humano sob diferentes tratamentos e condições de armazenamento ao longo do tempo. A) IL-5; B) IL-6.

Os resultados evidenciaram estabilidade distinto entre as amostras. A CRU apresentou variações significativas para ambas as citocinas (IL-5 e IL-6) ao longo do armazenamento, enquanto as amostras tratadas mantiveram concentrações reduzidas e estáveis. Esse comportamento sugere que os tratamentos impactam a fração bioativa, atenuando oscilações que refletem à dinâmica biológica do leite humano não tratado. Os maiores teores em CRU-D90 e CRU-D180 indicam ajustes entre os mediadores com funções pró-inflamatórias e imunorreguladores, destacando a natureza biologicamente ativa do leite humano (Kielbasa; Gadzała-Kopciuch; Buszewski, 2021).

Para IL-5 (Figura 3a), observou-se aumento de aproximadamente 60% ao longo do armazenamento da CRU, com elevação de $0,87 \pm 0,01$ pg mL⁻¹ em D0 para $1,39 \pm 0,01$ pg mL⁻¹ em D90. Em contraste, as amostras tratadas mantiveram concentrações inferiores e estáveis sem diferenças significativas, sugerindo que o tratamento limita a manutenção ou liberação dessa citocina. Esse comportamento pode estar associado à integridade da MFGM (Silva et al., 2026), cuja preservação na ausência de tratamento pode favorecer a proteção de proteínas bioativas e sua funcionalidade imunológica, ao passo que os tratamentos podem comprometer essa estrutura. Considerando o papel da MFGM no desenvolvimento e na função imune neonatal, sendo esses achados destacam a relevância do leite humano cru, especialmente para prematuros.

Este é um dos poucos estudos a detectar e quantificar IL-5 em leite humano pasteurizado e liofilizado, sendo precedido por Neia et al., (2022b), que também não observaram diferenças significativas após o tratamento, corroborando a similaridade entre as amostras no D0.

Ressalta-se ainda que, os tratamentos aplicados às amostras seguem as recomendações dos bancos de leite humano brasileiros, reconhecidos como a maior rede de bancos de leite humano do mundo e modelo internacional em segurança e padronização microbiológica (Ferreira et al., 2025) .

Em relação à IL-6 (Figura 3b), as concentrações foram superiores às de IL-5 em todas as condições, variando de $3,65 \pm 0,01 \text{ pg mL}^{-1}$ (LIO₂₅-D₁₈₀) a $24,27 \pm 2,60 \text{ pg mL}^{-1}$ (CRU-D₁₈₀), em concordância com a literatura, que descreve IL-6 como uma das citocinas mais abundantes no leite humano (Böttcher et al., 2000). As amostras tratadas apresentaram menores concentrações desde Do, indicando que a pasteurização exerce impacto significativo na diminuição de IL-6 (Delgado et al., 2014).

A IL-6 é classicamente associada a respostas inflamatórias, mas também exerce funções metabólicas, especialmente em interações com a fração lipídica. Níveis mais altos de AGPIs da série n-3, como EPA e DHA, podem minimizar a produção de IL-6 (Kielbasa; Gadzała-Kopciuch; Buszewski, 2021), o que explica os menores níveis associados a CRU-Do e CRU-D₃₀, período caracterizado por maior teor desses ácidos graxos.

A elevação de IL-6 ao longo do armazenamento pode estar relacionado à sua atuação no metabolismo lipídico, uma vez que essa citocina estimula processos de lipólise e oxidação de ácidos graxos (Van Hall et al., 2003). Esse efeito pode contribuir para a remodelação do perfil lipídico, incluindo a redução de 16:0, possivelmente associada à menor incorporação de palmitato em triacilgliceróis, padrão observado nas amostras a partir de D₆₀. Adicionalmente, alterações no equilíbrio n-6/n-3 ao longo do tempo podem gerar um ambiente mais pró-inflamatório (Ientz et al., 2023), consistente com os maiores níveis de IL-6 observados em períodos prolongados.

Desta forma, embora os tratamentos aplicados em bancos de leite humano sejam essenciais para garantir a segurança microbiológica, observa-se que esses processos podem impactar a fração bioativa, devido à sensibilidade térmica das citocinas (Delgado et al., 2014). Nesse contexto, CRU apresentou maior preservação de componentes imunológicos, enquanto os tratamentos, embora necessários, resultaram na redução parcial desse potencial. Em conjunto, os resultados contribuem para a compreensão da estabilidade bioativa do leite humano ao longo do armazenamento, auxiliando na definição de estratégias que conciliam segurança microbiológica e manutenção da qualidade funcional para a nutrição neonatal.

Análise multivariada sobre os biomarcadores inflamatórios

A PCA foi empregada como técnica exploratória multivariada para avaliar a similaridade entre os tratamentos (CRU, PAST e LIO) em relação à estabilidade da composição de ácidos graxos e citocinas ao longo do armazenamento (Figura 4). Os três primeiros componentes explicaram 69,3% da variância total ($PC_1 = 31,8\%$, $PC_2 = 21,1\%$ e $PC_3 = 16,4\%$). Os biomarcadores inflamatórios projetados como *loadings* (vermelho) e as amostras como *scores* (preto), evidenciando a organização dos dados e a formação de agrupamentos distintos entre tratamentos e tempos.

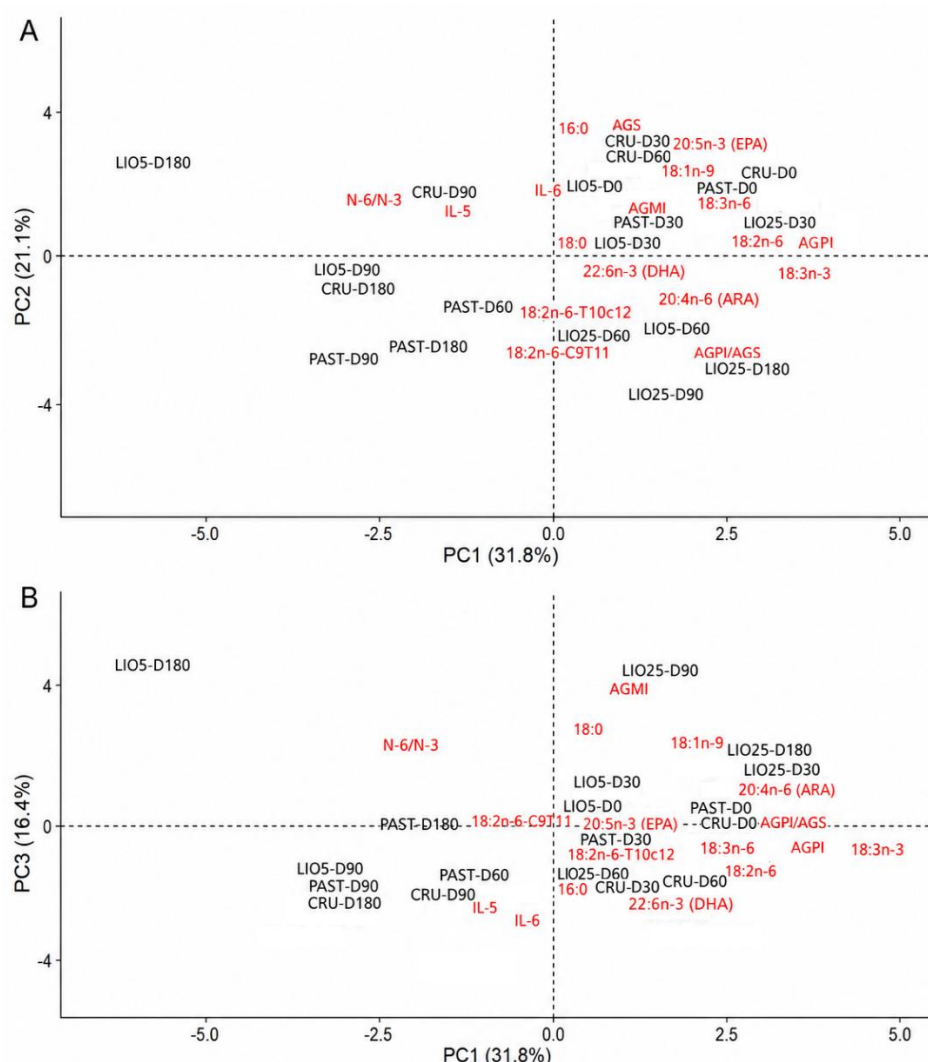


Figura 4. Biplot de PCA da estabilidade de ácidos graxos e citocinas em leite humano sob diferentes tratamentos e condições de armazenamento ao longo do tempo. A) PC_1 x PC_2 ; B) PC_1 x PC_3 .

Na Figura 4A, CRU-Do, CRU-D30, CRU-D60, PAST-Do, PAST-D30, LIO-Do, LIO5-D30 e LIO25-D30 associaram-se a 16:0, 18:0, 18:1n-9, EPA, DHA e às frações AGS, AGMI e

AGPI. Isto indica um perfil equilibrado de ácidos graxos, com potencial modulador da resposta inflamatória neonatal (Ientz et al., 2023; Kielbasa; Gadzała-Kopciuch; Buszewski, 2021; Muxfeldt et al., 2025). A proximidade das amostras do Do no mesmo quadrante sugere a preservação da composição de ácidos graxos após pasteurização e liofilização, em concordância com a literatura (Martysiak-Żurowska; Rożek; Puta, 2022; Neia et al., 2022a). Ainda, foi observado que, CRU manteve estabilidade dos ácidos graxos até D60, enquanto PAST, LIO5 e LIO25 apenas até D30, indicando maior suscetibilidade a alterações após o tratamento, possivelmente devido a modificações na integridade MFGM (Silva et al., 2026). Da mesma forma, Wang et al., (2025) indicaram que o armazenamento prolongado causa perda significativa de espécies lipídicas do MFGM.

Em contraste, LIO25-D60, LIO25-D90, LIO25-D180 e LIO5-D60 associaram-se a ARA, 18:3n-3, isômeros de 18:2n-6 (t10,c12 e c9,t11) e à razão AGPI/AGS, indicando mudanças na composição de ácidos graxos. Contudo, a disposição das amostras LIO25 nessa região sugere estabilidade dos ácidos graxos a longo prazo, em concordância com as indicações de Cheema et al., (2025), que reforçam o potencial do armazenamento em temperatura ambiente para aumentar a viabilidade e reduzir custos. Por outro lado, CRU-D90 e LIO5-D180 associaram-se à razão n-6/n-3 e às citocinas IL-5 e IL-6, sugerindo desbalanço lipídico e possível modulação da resposta inflamatória (Kielbasa; Gadzała-Kopciuch; Buszewski, 2021), enquanto LIO5-D90, CRU-D180, PAST-D60, PAST-D90 e PAST-D180 não apresentaram associação definida, indicando perda de organização do perfil funcional ao longo do armazenamento.

17

Na Figura 4B, CRU-Do, PAST-Do, LIO-Do, LIO5-D30, LIO25-D30, LIO25-D90 e LIO25-D180 associaram-se a AGMI, 18:0, 18:1n-9, ARA e à razão AGPI/AGS. A proximidade de CRU-Do, LIO-Do, PAST-Do e PAST-D30 ao eixo de PC3 indica baixa separação entre os grupos e similaridade entre as amostras. Além disso, a relação de LIO25-D60, CRU-D30 e CRU-D60, associados a 18:2n-6, 18:3n-6, DHA e totais de AGPIs e AGSs, sugere um perfil intermediário, com ajustes na composição de ácidos graxos ao longo do armazenamento, sem perda completa da funcionalidade.

Por outro lado, PAST-D180, PAST-D60, CRU-D90, PAST-D90, CRU-D180 e LIO5-D90 agruparam-se com IL-5 e IL-6, indicando maior relação com a modulação da resposta inflamatória, possivelmente decorrente de alterações acumuladas durante o armazenamento. Destaca-se CRU-D90, que manteve associação com as citocinas, reforçando os achados da Figura 4A. A PAST-D180 associou com a razão n-6/n-3, embora com baixa contribuição devido

posicionou ao eixo de PC₃. Em contraste, LIO₅-D₁₈₀ apresentou perfil isolado e distinto, indicando que o armazenamento prolongado do leite humano liofilizado sob refrigeração tenha diferenças significativas em relação às demais amostras.

De forma inovadora, este estudo avaliou aplicações práticas de tratamento e armazenamento do leite humano realizadas por bancos de leite humano, integrando avaliação da estabilidade de ácidos graxos e citocinas IL-5 e IL-6. Isto supera abordagens isoladas encontradas na literatura (Lozano et al., 2014; Manin et al., 2019; Martysiak-Żurowska; Rožek; Puta, 2022). Os resultados demonstraram que o armazenamento altera a composição bioativa do leite humano, confirmando seu caráter dinâmico e fornecendo subsídios para a definição de prazos de validade e manutenção da qualidade funcional. Recém-nascidos prematuros e de baixo peso demandam maior necessidade de ingerir compostos bioativos para suporte imunológico e nutricional adequado, enquanto para crianças com maior maturidade fisiológica podem ter o leite humano doado e tratado como uma estratégia para o aleitamento e a redução de riscos neonatais (Ferreira et al., 2025; Muxfeldt et al., 2025). Ainda, são necessárias novas investigações que considerem outras variáveis da composição bioativa em condições reais de armazenamento para melhor definição da validade do leite humano.

CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram dois períodos distintos no perfil de ácidos graxos (D₀-D₃₀ e D₆₀-D₁₈₀), com similaridade entre CRU, PAST e LIO no início e, posteriormente, predominância do tempo como principal fator de separação. Nesse cenário, CRU mostrou maior suscetibilidade à degradação enzimática, PAST apresentou alterações associadas à MFGM e LIO destacou-se pela maior estabilidade lipídica devido à ausência de água. Entre as condições de liofilização, LIO₂₅ indicou maior razão n-6/n-3, enquanto LIO₅ preservou melhor a relação AGPI/AGS, evidenciando o efeito da temperatura. IL-5 e IL-6 foram sensíveis aos tratamentos, com menores níveis em LIO e PAST e valores mais elevados e crescentes em CRU, acompanhando as maiores alterações no perfil lipídico. A PCA confirmou a separação temporal, com predominância inicial de ácidos graxos de perfil mais anti-inflamatório. Em conjunto, tratamento, tempo e temperatura foram determinantes para a qualidade lipídica e imunológica do leite humano, destacando a liofilização com armazenamento sob refrigeração como estratégia promissora. Contudo, a escolha do tratamento deve considerar as necessidades do

neonato, e o período avaliado, inferior ao recomendado para leite humano liofilizado, reforça a necessidade de estudos mais longos para validar sua estabilidade ao longo do tempo.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Cargill e ao Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS) pelo apoio financeiro. Agradecem também ao Banco de Leite Humano do Hospital Universitário de Maringá pela parceria e doação de amostras de leite humano.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 918, de 19 de Setembro de 2024 - Funcionamento Humano, Bancos de Leite.** Disponível em: <https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/181/rdc_918_2024_.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2025.

ALVES, Eloize da Silva *et al.* A realidade da liofilização do leite humano: Uma estratégia ou desafio? In: **Avanços, Inovações e Saberes em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Vol.4.** 4th ed. São Paulo: Editora Científica Digital, 2025. p. 37–50.

BOMFIM, Vanessa S. *et al.* Human milk enriched with human milk lyophilisate for feeding very low birth weight preterm infants: A preclinical experimental study focusing on fatty acid profile. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0202794, 25 set. 2018.

BORGO, Luiz Antônio *et al.* Are fat acids of human milk impacted by pasteurization and freezing? **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 3, p. 1386–1393, 2015.

BÖTTCHER, Malin F. *et al.* Cytokines in Breast Milk from Allergic and Nonallergic Mothers. **Pediatric Research**, v. 47, n. 1, p. 157–157, jan. 2000.

CAVAZOS-GARDUÑO, A. *et al.* Effect of Pasteurization, Freeze-drying and Spray Drying on the Fat Globule and Lipid Profile of Human Milk. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 4, n. 5, p. 296–302, 2016.

CHEEMA, Simran Kaur *et al.* Freeze-drying donor human milk allows compositional stability for 12 months at ambient temperatures. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 137, p. 106936, jan. 2025.

CONBOY-STEPHENSON, Ruth *et al.* Donor human milk: the influence of processing technologies on its nutritional and microbial composition. **Frontiers in Nutrition**, v. 11, n. November, p. 1–22, 2024.

DE OLIVEIRA, Samira C. *et al.* Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and

disintegration of human milk under in vitro dynamic term newborn digestion. **Food Research International**, v. 88, p. 263–275, out. 2016.

DELGADO, Francisco J. *et al.* Tocopherols, fatty acids and cytokines content of holder pasteurised and high-pressure processed human milk. **Dairy Science & Technology**, v. 94, n. 2, p. 145–156, 4 mar. 2014.

FERREIRA, Cintia Stefhany Ripke *et al.* Optimized application of UV-C radiation in human milk: Combined effects on microbiological control of total coliforms and *Lactobacillus* spp., and the quality of fatty acids and minerals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 141, p. 107332, maio 2025.

FRIEND, B. A. *et al.* Evaluation of Freeze-Drying, Pasteurization, High-Temperature Heating and Storage on Selected Enzymes, B-Vitamins and Lipids of Mature Human Milk. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 4, p. 330–334, abr. 1983.

GAO, Chang *et al.* Changes to breast milk fatty acid composition during storage, handling and processing: A systematic review. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 146, p. 1–10, jul. 2019.

HAHN, Won-Ho *et al.* The freeze-drying does not influence the proteomic profiles of human milk. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 33, n. 12, p. 2069–2074, 17 jun. 2020.

IENTZ, Gislaine *et al.* Effects of Pasteurization and Freeze Drying on Proximal Composition, Fatty Acids Composition and Lipid Quality in Colostrum Human Milk. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 12, p. 1887–1897, 2023.

ISLAM, Fakhar *et al.* Functional roles and novel tools for improving-oxidative stability of polyunsaturated fatty acids: A comprehensive review. **Food Science & Nutrition**, v. 11, n. 6, p. 2471–2482, 28 jun. 2023.

KIEŁBASA, Anna; GADZAŁA-KOPCIUCH, Renata; BUSZEWSKI, Bogusław. Cytokines-Biogenesis and Their Role in Human Breast Milk and Determination. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6238, 9 jun. 2021.

LOZANO, Blanca *et al.* Vitamins, fatty acids, and antioxidant capacity stability during storage of freeze-dried human milk. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 6, p. 703–707, 19 set. 2014.

MANIN, Luciana *et al.* Evaluation of the Lipid Quality of Lyophilized Pasteurized Human Milk for Six Months by GC-FID and ESI-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 8, p. 1579–1586, 2019.

MARTYSIAK-ŻUROWSKA, Dorota; ROŻEK, Patrycja; PUTA, Małgorzata. The effect of freeze-drying and storage on lysozyme activity, lactoferrin content, superoxide dismutase activity, total antioxidant capacity and fatty acid profile of freeze-dried human milk. **Drying Technology**, v. 40, n. 3, p. 615–625, 1 fev. 2022.

MUXFELDT, Luana Cruz *et al.* Nutritional quality of fatty acids from donated human milk, infant formulas and human milk fortifier. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 108216,

ago. 2025.

NEIA, Vanessa *et al.* Lipid Profile of Human Milk in Different Lactation Stages Submitted to Pasteurization, Lyophilization and Spray-Drying Processes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n. 1, p. 54–62, 2022a.

NEIA, Vanessa Javera Castanheira *et al.* Effect of lyophilization and spray-drying on cytokine levels and antioxidant capacity in human milk. **Drying Technology**, v. 40, n. 15, p. 3149–3159, 15 nov. 2022b.

RIBEIRO, Otávio A. S. *et al.* Fatty acid profile of non-conforming pooled human milk as affected by the processing and storage conditions. **International Journal of Research - GRANTHAALAYAH**, v. 9, n. 2, p. 46–54, 19 fev. 2021.

SILVA, Cristiane R. *et al.* Comparison of the Stability of Fatty Acid Composition in Freeze-Dried, Pasteurized, and Raw Human Milk During Long-Term Storage. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 37, p. 1–10, 2026.

SPROAT, Thomas D. R.; GHOSH, Anirban; ALSHAIKH, Belal N. Lyophilized (freeze-dried) human milk for preterm infants: a scoping review. **Journal of Perinatology**, v. 44, n. 5, p. 612–627, 15 maio 2024.

VAN HALL, Gerrit *et al.* Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 7, p. 3005–3010, jul. 2003.

WANG, Shaolei *et al.* Effects of refrigeration and freezing on milk fat globule membrane lipids in stored breast milk: Insights from non-targeted lipidomics. **Food Chemistry**, v. 468, p. 142478, mar. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global nutrition targets 2030: breastfeeding brief**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/B09382>>. Acesso em: 11 fev. 2026.

ZHU, Dan *et al.* Impact of freeze-drying and subsequent storage on milk metabolites based on 1H NMR and UHPLC-QToF/MS. **Food Control**, v. 116, p. 107017, out. 2020.

21