



TFG del Grado en Ingeniería de la Salud

Influencia de la suplementación con bifidobacterias en el estado oxidativo de deportistas de Crossfit Documentación Técnica

Presentado por Ignacio González Arnaiz en Universidad de Burgos

8 de julio de 2024

Tutores: Natalia Busto Vázquez

# Índice general

Indice general	
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iv
Apéndice A Plan de Proyecto Software	1
A.1. Introducción	1
A.2. Planificación temporal	1
A.3. Planificación económica	
A.4. Viabilidad legal	
Apéndice B Documentación de usuario	Ę
B.1. Requisitos software y hardware para ejecutar el proyecto	
B.2. Instalación / Puesta en marcha	Ę
Apéndice C Manual del investigador	7
C.1. Estructura de directorios	7
C.2. Instrucciones para la modificación o mejora del proyecto	7
Apéndice D Descripción de adquisición y tratamiento de datos	9
D.1. Descripción formal de los datos	Ć
D.2. Descripción clínica de los datos	Ć
Apéndice E Manual de especificación de diseño	11
E.1. Planos	11
E.2. Diseño arquitectónico	11

II Índice general

Apéndice F Especificación de Requisitos	13
F.1. Diagrama de casos de uso	13
F.2. Explicación casos de uso	13
F.3. Prototipos de interfaz o interacción con el proyecto	13
Apéndice G Estudio experimental	15
G.1. Cuaderno de trabajo	15
G.2. Configuración y parametrización de las técnicas	22
G.3. Detalle de resultados	23
Apéndice H Anexo de sostenibilización curricular	25
H.1. Introducción	25
H.2. Derechos Humanos y Valores Democráticos	25
H.3. Igualdad de Género y No Discriminación	26
H.4. Accesibilidad Universal	26
H.5. Sostenibilidad y Cambio Climático	26
H.6. Reflexión Personal	27
Bibliografía	29

## Índice de figuras

A.1.	Diagrama de O	Gantt	de la	planificación	temporal.	Fuente	propia	
	con GanttPRC	)						2

		4_	+	1
ma	ıce	ue	tab	las

				and the second second	_		_
Λ 1	Dogglogo	പപ	progunuacto	experimental.	Fuonto pr	onio	•
л.т.	Desgrose	: uei	. Dresubuesto	experimental.	ruente br	obia .	 

## Apéndice A

## Plan de Proyecto Software

#### A.1. Introducción

Aunque este Trabajo de Fin de Grado no se centre en el desarrollo de un software, sino en un ensayo experimental sobre el efecto de la suplementación con probióticos en deportistas de Crossfit, se ha considerado importante incluir igualmente un plan de proyecto software. Esto se debe a que, al tratarse de una investigación que implica distintas fases, es de vital importancia contar con una adecuada planificación temporal, económica y legal para garantizar la viabilidad y el éxito del proyecto.

El plan de proyecto software abordará los siguientes aspectos clave:

#### A.2. Planificación temporal

La planificación temporal de la investigación se llevó a cabo en tres etapas principales y fue desarrollada teniendo en cuenta las necesidades de la investigación y las circunstancias personales (Figura A.1).

La primera etapa fue la fase experimental y bibliográfica, que se realizó durante los meses de febrero a abril. Esta fase incluyó la cuantificación de proteínas mediante Bradford y Nanodrop, la cuantificación de proteínas carboniladas, la cuantificación de peroxidación lipídica mediante Malondialdehido, y la cuantificación de la capacidad antioxidante total mediante FRAP, así como la cuantificación del glutatión reducido y oxidado. Cada experimento se realizó siguiendo los protocolos establecidos, garantizando de este modo la precisión y fiabilidad de los resultados. Se llevó también a

cabo una amplia búsqueda bibliográfica en torno al tema de este Trabajo de Fin de Grado.

Seguidamente, durante el mes de mayo se procedió con el análisis de los datos experimentales. Esta etapa implicó el uso de software especializado (Microsoft Excel y Statgraphics 19) para la interpretación de los resultados experimentales y la aplicación de técnicas estadísticas adecuadas, como el ANOVA, para determinar la significancia de los datos.

Finalmente, de manera progresiva y finalizando en junio, se llevó a cabo la redacción de la memoria y los anexos. Esta fase incluyó la documentación detallada de cada una de las etapas anteriores, la organización y presentación de los resultados y la elaboración de las conclusiones finales. Se hizo hincapié en la claridad y coherencia del documento, asegurando que reflejara fielmente todo el proceso de investigación y los hallazgos obtenidos. La memoria fue estructurada de manera que su comprensión fuera simple y sirviera como referencia para futuros estudios en el área.



Figura A.1: Diagrama de Gantt de la planificación temporal. Fuente propia con GanttPRO

#### A.3. Planificación económica

Se va a desglosar un presupuesto aproximado de los costes experimentales, considerando materiales, los equipos y cualquier otro recurso necesario ya que una gestión económica adecuada es primordial para mantener el proyecto dentro de dicho presupuesto.

Para este presupuesto se van a considerar 3 grandes grupos, los materiales, los equipos y otros recursos. Se ha tenido en cuenta también la realización cada método experimental una única vez, salvo el malondialdehído que tuvo que realizarse tres veces para lograr obtener un resultado correcto. Los precios fueron calculados con ayuda de la tutora y de manera aproximada, puesto que variaban mucho dependiendo del distribuidor y de la cantidad adquirida.

En primer lugar, teniendo en cuenta que se partió originalmente de 82 muestras, el presupuesto de materiales y reactivos para los 7 ensayos (Bradford, Nanodrop, Carbonilos, MDA, FRAP, GSH y GSSG) es aproximadamente de 2350€.

El presupuesto para los equipos y software es notablemente más elevado que el de materiales y reactivos ya que es sabido que los equipos utilizados en un laboratorio tienen un alto coste económico. El coste de todos los equipos utilizados para este TFG es de alrededor de 93000€. No obstante, se ha decidido prorratear el coste de cada equipo con el de esta investigación ya que cada uno de los equipos utilizados no son específicos para este ensayo, sino que sirven para multitud de proyectos, y de este modo se obtiene un presupuesto más asequible y ajustado. El presupuesto total prorrateado para la investigación es de 3350€.

Por último, como otros recursos se ha tenido en cuenta la gestión de residuos, el uso de electricidad para los equipos y el agua, obteniendo un presupuesto aproximado de  $200 \in$ . Se ha incluido también como recursos, el trabajo del personal. Teniendo en cuenta que un biólogo en España tiene un salario promedio de  $13 \in$  la hora [11], se calcula que aproximadamente el coste de un investigador para todo el proyecto es de  $1760 \in$ 

Concluyendo, el presupuesto total teniendo en cuenta materiales  $(2350 \ensuremath{\in})$ , equipos y software  $(3350\ensuremath{\in})$  y recursos  $(1760\ensuremath{\in})$ , asciende a un total aproximado de  $7460\ensuremath{\in}$  (Tabla A.1).

Concepto	Coste Aproximado (€)
Materiales y Reactivos	2350
Equipos y Software	3350
Otros Recursos	1760
Total	7460

Tabla A.1: Desglose del presupuesto experimental. Fuente propia

Un posible plan de explotación de este proyecto sería la colaboración con nutricionistas para establecer criterios de suplementación con probióticos, vendiendo los conocimientos adquiridos gracias al ensayo, en caso de unos resultados favorables de la investigación.

#### A.4. Viabilidad legal

Este apartado se centra en el cumplimiento de las leyes y regulaciones vigentes, asegurando un manejo adecuado de los datos y el uso de licencias apropiadas para las aplicaciones utilizadas. A continuación, se detallan los aspectos clave de esta viabilidad:

- 1. Aprobación del Comité de Bioética: Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (23/06/2022), lo que garantiza que todas las actividades experimentales se llevan a cabo conforme a los principios éticos y legales aplicables. El informe favorable del comité respalda la adecuación ética de los métodos y procedimientos empleados en el estudio.
- 2. Cumplimiento de las Leyes y Regulaciones del Tratamiento de Datos: Este ensayo se ajusta a las normativas de protección de datos personales [5], garantizando que cualquier información recopilada se maneje de manera segura y confidencial. La obtención del consentimiento informado [4] de los participantes es un aspecto primordial que remarcar, ya que asegura que los sujetos comprendan el propósito del estudio y cómo serán utilizados sus datos.
- 3. Licencias de Aplicaciones: Se ha llevado a cabo una verificación de todas las aplicaciones y software utilizados durante el proyecto, asegurando que cumplen con las respectivas licencias. Esto garantiza que el uso de herramientas informáticas sea legal y conforme a los términos de servicio establecidos por los proveedores. Las aplicaciones que cuentan con licencia han sido las siguientes:
  - Microsoft Excel [12]
  - Statgraphics 19 [10]
  - Gen 5 Microplate Reader and Imager Software [1]
  - NanoDrop DeNovix [6]

## Apéndice B

## Documentación de usuario

# B.1. Requisitos software y hardware para ejecutar el proyecto.

Para la correcta ejecución del proyecto, se requiere un conjunto de recursos de software y hardware específicos. A nivel de software, se necesita la instalación del programa Microsoft Excel para el análisis de datos, junto con el programa Statgraphics 19 para el análisis estadístico. Además, es requerido el uso de la herramienta de publicación y redacción Overleaf para la gestión de la memoria y el anexo. En cuanto a los requisitos de hardware, se necesita un ordenador con la memoria suficiente y la capacidad de procesamiento adecuada para el manejo de los datos experimentales.

#### B.2. Instalación / Puesta en marcha

Para poder analizar el proyecto correctamente, se recomienda seguir los siguientes pasos:

- 1. Instalar Microsoft Excel y Statgraphics 19 en el ordenador desde el que se analizará el proyecto.
- 2. Crear una cuenta en Overleaf y configurar el entorno para la lectura de la memoria y el anexo (si se prefiere, se puede llevar a cabo la lectura mediante los archivos PDF entregados).
- 3. Asegurarse de que el ordenador cumpla con los requisitos de hardware necesarios mencionados anteriormente.

## Apéndice C

## Manual del investigador

#### C.1. Estructura de directorios

Los documentos entregados comprenden varios elementos cruciales para la investigación realizada. En primer lugar, se entrega en formato PDF la memoria del proyecto que presenta el contexto teórico, metodológico y los hallazgos principales del estudio. Además, se incluyen los archivos Excel que detallan los resultados obtenidos en cada experimento, proporcionando datos cuantitativos y cualitativos clave para el posterior análisis estadístico y sus respectivos archivos Statgraphics con los análisis estadísticos. Complementando estos documentos, se encuentra el anexo en formato PDF que ofrece información adicional relevante para la comprensión integral de los resultados y el procedimiento experimental empleado. Todos estos materiales forman un conjunto completo que respalda de manera efectiva el estudio realizado.

# C.2. Instrucciones para la modificación o mejora del proyecto.

Para que el trabajo pueda ser mejorado en futuras ediciones, se podrían seguir una serie de pautas que se detallan a continuación:

 Ampliar las fronteras del estudio mediante la consideración de un mayor número de sujetos a evaluar para lograr unos resultados estadísticamente más significantes. Se podría también diversificar la población diana del estudio, con un mayor rango de edad y centrándose en distintas modalidades deportivas.

- Ampliar el número de biomarcadores de estrés oxidativo a analizar.
- Estudiar la relación entre los distintos biomarcadores de estrés oxidativo para la obtención de un único índice.
- Incorporar técnicas avanzadas de análisis de datos, como por ejemplo el uso de algoritmos de aprendizaje automático, para mejorar la interpretación de los biomarcadores de estrés oxidativo.
- Realizar un seguimiento longitudinal de los participantes del ensayo para poder evaluar los efectos de la suplementación con probióticos a largo plazo.
- Incluir un grupo de control adicional que no reciba ningún tipo de suplementación ni realice ejercicio, para tener una referencia más robusta de los efectos observados
- Evaluar los posibles efectos secundarios de la suplementación con probióticos.
- Estudiar la interacción entre la suplementación con probióticos y otros suplementos nutricionales o medicamentos que los sujetos puedan estar tomando.

## Apéndice D

# Descripción de adquisición y tratamiento de datos

#### D.1. Descripción formal de los datos

Los datos recibidos por la Universidad de Burgos son muestras biológicas, que son recibidas en formato físico y conservadas a una temperatura de -20°C, para evitar la degradación de los biomarcadores que se van a analizar.

### D.2. Descripción clínica de los datos

Desde una perspectiva clínica, los datos recibidos son muestras biológicas de tipo sanguíneo, extraídas a deportistas de Crossfit participantes en el estudio en momentos distintos (en estado basal, en estado basal post-ejercicio, tras la intervención en reposo y después del ejercicio intenso) cuyo plasma ha de ser procesado para la realización de los análisis correspondientes.

## Apéndice ${\cal E}$

# Manual de especificación de diseño

- E.1. Planos
- E.2. Diseño arquitectónico

## Apéndice F

## Especificación de Requisitos

- F.1. Diagrama de casos de uso
- F.2. Explicación casos de uso.
- F.3. Prototipos de interfaz o interacción con el proyecto.

## Apéndice G

## **Estudio** experimental

## G.1. Cuaderno de trabajo.

Los métodos utilizados para el desarrollo de este ensayo son los siguientes:

#### Cuantificación de proteínas mediante Bradford

#### Marco teórico

Está basado en la cuantificación de proteínas mediante su unión al colorante Azul de Coomassie G-250 4.1, formando un complejo azul de distintas intensidades, en función de la concentración proteica de la muestra. La cuantificación de las proteínas se mide mediante espectrofotometría a 595 nm [13].

- 1. Mezclar el reactivo Bradford en la botella y llevarlo a temperatura ambiente.
- 2. Preparar los estándares de proteína en el buffer (tampón fosfato) entre 0.1-1.4 mg/mL. Utilizar el estándar de proteína BSA en otro estándar de proteína equivalente.
- 3. Añadir 5  $\mu$ L de los estándares de proteínas en los pocillos separados de la placa de 96 pocillos. Para los pocillos blancos añadir 5  $\mu$ L del buffer.

- 4. Preparar las muestras desconocidas con una concentración aproximada de 0.1-1.4 mg/mL.
- 5. Añadir a cada pocillo en uso 250  $\mu$ L de Bradford y mezclar en una agitadora durante aproximadamente 30 segundos.
- 6. Incubar a temperatura ambiente entre 5 y 45 minutos. Medir la absorbancia a 595 nm. Hay que recordar que el complejo proteína-colorante es estable hasta los 60 minutos.
- 7. Graficar la absorbancia neta versus la concentración de proteína estándar.
- 8. Determinar la concentración de proteína en la muestra comparando los valores de absorbancia neta a 595 nm contra la curva estándar.
- Cálculos: la concentración de proteína, en μg/μL, se calculó a partir de la recta de calibrado.
- Reactivos:
  - Reactivo de Bradford
  - Solución estándar de proteína BSA (albúmina de suero bovino)
  - Buffer (tampón fosfato)

#### Cuantificación de proteínas mediante Nanodrop

#### Marco teórico

La cuantificación espectrofotométrica con Nanodrop se basa en la medición de la cantidad lumínica que puede absorber la muestra a distintas longitudes de onda, y midiendo de este modo concentración de proteínas totales sin distinguir su actividad [9].

- 1. Homogeneizar la muestra con el vórtex.
- 2. Hacer una dilución de 10:1000.
- 3. Pipetear 1  $\mu$ L de la disolución y depositarlo en el objetivo del Nanodrop.

- 4. Medir la absorbancia de la muestra en el Nanodrop.
- 5. Anotar el resultado de concentración proteica mostrada en la pantalla del Nanodrop.
- Cálculos: la concentración de proteína mostrada en la pantalla del Nanodrop es en mg/mL, se calculó convirtiéndola a g/dL y multiplicándola por la dilución.
- Reactivos: no se requieren reactivos específicos

#### Cuantificación de proteínas carboniladas

#### Marco teórico

Está basado en la unión covalente de la 2,4- dinitrofenilhidracina a los grupos carbonilos de las proteínas que es cuantificada mediante espectrofotometría a 370 nm [8].

- 1. Mezclar 25  $\mu \rm L$  de plasma con DNPH 10 mM, previamente disuelto en HCl 2.5 M.
- 2. Incubar la mezcla a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 15 minutos.
- 3. Agitar cada 5 minutos los tubos en un vórtex para favorecer la reacción entre los grupos carbonilo y la DNPH.
- 4. Precipitar las proteínas plasmáticas totales con ácido tricloroacético (TCA) al 10% en frío durante 30 minutos.
- 5. Centrifugar a 2100 g durante 30 minutos a 4°C para la obtención de los pellets proteicos.
- 6. Lavar y centrifugar los pellets dos veces con una mezcla fría de etanol y acetato de etilo (1:1) para la eliminación del exceso de DNPH.
- 7. Disolver los pellets en guanidina-HCl 6 M.
- 8. Transferir las muestras a una placa de 96 pocillos.
- 9. Medir la absorbancia a 370 nm.

 Cálculos: la concentración de proteínas carboniladas, en nM/mg de proteína, se calculó a partir de la absorbancia obtenida y el coeficiente de extinción molar.

#### ■ Reactivos:

- Dinitrofenilhidracina (DNPH) 10mM (disuelto en HCl 2.5 M)
- Ácido tricloroacético (TCA) (10 % p/v)
- Etanol y acetato de etilo (1:1 v/v)
- Guanidina-HCl 6M

#### Cuantificación de peroxidación lipídica mediante Malondialdehído (MDA)

#### Marco teórico

Está basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico por el ataque en sus grupos metilenos activos del malondialdehído que es cuantificada mediante un espectrofotómetro a 530 nm [3].

- 1. Precipitar 30  $\mu$ L de plasma con 60  $\mu$ L de TCA (8% p/v).
- 2. Enfriar durante 10 minutos a 4°C.
- 3. Centrifugar a 2100 G durante 15 minutos y a una temperatura de 4ºC.
- 4. Lavar el pellet proteico con 140  $\mu$ L de TCA (6 % p/v).
- 5. Obtención del pellet proteico.
- 6. Añadir 200  $\mu$ L de TBA (0.67 % p/v) y H2SO4 (1 % v/v).
- 7. Incubar a 60°C durante 90 minutos.
- 8. Enfriar en hielo.
- 9. Centrifugar a 2100 G durante 15 minutos y a una temperatura de 4ºC
- 10. Medir la absorbancia de 100  $\mu L$  de sobrenadante en el espectrofotómetro a 530 nm.

■ Cálculos: la concentración de peroxidación lipídica, en nM/mg de proteína, se calculó a partir de la curva de calibrado construida en el rango de 0-0.06 nmol MDA.

#### ■ Reactivos:

- Acido tricloroacético TCA (8 % p/v)
- Acido tricloroacético TCA (6 % p/v)
- H2SO4 (1 % v/v) (1,1ml de H2SO4 95 % a 25ml de volumen)
- Ácido tiobarbitúrico TBA (0,67 % p/v) (0,167g de TBA disuelto en 25ml)

#### Cuantificación de la capacidad antioxidante total mediante Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

#### Marco teórico

Está basado en la cuantificación del nivel de reducción del ion férrico (localizado en el reactivo FRAP), a ion ferroso causado por la presencia de antioxidantes en la muestra. La reducción provoca un compuesto azulado, cuya intensidad depende del poder antioxidante, que es medido mediante espectrofotometría a 593 nm [2].

- 1. Preparar la solución de TPTZ (10 mM) en HCl (40 mM) con cloruro férrico (20 mM) y tampón acetato (pH 3.6).
- 2. Preparar el patrón de Trolox (10 mM en etanol) con 6 diluciones seriadas.
- 3. Incubar la muestra de plasma con la solución de TPTZ durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4. Medir la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a 593 nm.
- Cálculos: la concentración de capacidad antioxidante total, en equivalente de Trolox  $\mu$ M, se calculó a partir de la curva de calibrado.
- Reactivos:
  - TPTZ (10 mM)

- HCl (40 mM)
- Cloruro férrico (20 mM)
- Tampón acetato (pH 3.6)
- Trolox (10 mM en etanol)
- Etanol

#### Cuantificación del glutatión reducido (GSH)

#### Marco teórico

Método basado en la fluorescencia que se produce por la reacción específica entre el glutatión reducido y el oftalaldehido (OPA). La fluorescencia es excitada a 360 nm y medida la emisión a 460nm [7].

- 1. Mezclar 10  $\mu$ L de plasma con 12,5  $\mu$ L de HPO3 (25%) y 37  $\mu$ L de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0).
- 2. Incubar a 4°C durante 10 minutos.
- 3. Centrifugar a 2100G durante 20 minutos a 4°C.
- 4. Tomar 10  $\mu$ L del sobrenadante y mezclar con 10  $\mu$ L de OPA (0,1 % en metanol) y 180  $\mu$ L de tampón fosfato.
- 5. Tras 15 minutos de reacción se excita la fluorescencia a 360 nm y se mide a 460 nm.
- Cálculos: la concentración glutatión reducido, en nanogramos de proteína, se calculó a partir de la curva de calibrado construida en el rango de 0-40 ng/ $\mu$ L.
- Reactivos:
  - Orto-Ftaldehido (OPA) (0,1 % p/v en metanol)
  - HPO3 (25 % p/v)
  - Tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0)

21

#### Cuantificación del glutatión oxidado (GSSG)

#### Marco teórico

Método basado en la fluorescencia que se produce por la reacción específica entre el glutatión disulfuro y el oftalaldehido (OPA) pero eliminando el glutatión oxidado mediante N-etilmaleimida (forma un compuesto que no reacciona con OPA). La fluorescencia es excitada a 360 nm y medida la emisión a 460nm [7].

- 1. Mezclar 10  $\mu$ L de plasma con 12,5  $\mu$ L de HPO3 (25%) y 37  $\mu$ L de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0).
- 2. Incubar a 4°C durante 10 minutos.
- 3. Centrifugar a 2100G durante 20 minutos a 4°C.
- 4. Tomar 10  $\mu$ L del sobrenadante y mezclar con 4  $\mu$ L de NEM.
- 5. Dejar reaccionar durante 40 minutos.
- 6. Tomar 10  $\mu$ L del sobrenadante de la reacción anterior y mezclar con 10  $\mu$ L de OPA (0,1 % en metanol) y 180  $\mu$ L de tampón NaOH.
- 7. Tras 15 minutos de reacción se excita la fluorescencia a 360 nm y se mide a 460 nm.
- Cálculos: la concentración glutatión oxidado, en nanogramos de proteína, se calculó a partir de la curva de calibrado construida en el rango de 0-40 ng/ $\mu$ L.
- Reactivos:
  - Orto-Ftaldehido (OPA) (0,1 % p/v en metanol)
  - HPO3 (25 % p/v)
  - Tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0)
  - NEM (N-Etilamida 0,0088g/mL)
  - NaOH (0,1N)

## G.2. Configuración y parametrización de las técnicas

Los equipos necesarios para el correcto desarrollo de este ensayo son los siguientes:

- pH-metro PH50 VioLab
- Incubador IKA KS 4000 I control
- Incubador INDELAB
- Balanza analítica RADWAG AS 220.R2 PLUS
- Lector de placas BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader
- Centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16R Centrifuge
- Microcentrífuga Biocen 22R orto Alresa
- Congelador Whirlpool
- NanoDrop DeNovix DS-11
- Mezclador Vorticial Fisherbrand
- Agitador magnético digital con calefacción H03D series lbx instruments
- Sistema de agua desionizada Milli-Q Direct 8

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la totalidad de los experimentos son los siguientes:

- Reactivo de Bradford
- Solución estándar de proteína BSA (albúmina de suero bovino)
- Dinitrofenilhidracina (DNPH) 10mM (disuelto en HCl 2.5 M)
- Ácido tricloroacético (TCA) (10 % p/v)
- Etanol y acetato de etilo (1:1 v/v)
- Guanidina-HCl 6M
- Acido tricloroacético TCA (8 % p/v)

- Acido tricloroacético TCA (6 % p/v)
- H2SO4 (1 % v/v) (1,1ml de H2SO4 95 % a 25ml de volumen)
- $\blacksquare$ Ácido tiobarbitúrico TBA (0,67 % p/v) (0,167g de TBA disuelto en 25ml)
- TPTZ (10 mM)
- HCl (40 mM)
- Cloruro férrico (20 mM)
- Tampón acetato (pH 3.6)
- Trolox (10 mM en etanol)
- Etanol
- Orto-Ftaldehido (OPA) (0,1 % p/v en metanol)
- HPO3 (25 % p/v)
- Tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0)
- NEM (N-Etilamida 0,0088g/mL)
- NaOH (0,1N)

#### G.3. Detalle de resultados.

Los resultados de cada método probado se encuentran de forma detallada en cada anexo entregado en formato de Excel, junto con sus respectivos análisis estadísticos en formato Statgraphics.

## Apéndice H

# Anexo de sostenibilización curricular

#### H.1. Introducción

Este Trabajo de Fin de Grado sobre el efecto de la suplementación con probióticos en deportistas de Crossfit abarca diversos campos en relación con la sostenibilidad y la responsabilidad social, los cuales son explicados a continuación.

### H.2. Derechos Humanos y Valores Democráticos

Esta investigación se enmarca dentro de los principios éticos y de respeto a los derechos humanos fundamentales. Al tratarse de una investigación que involucra muestras biológicas humanas, se han seguido una serie de protocolos establecidos para garantizar la protección de los participantes, su autonomía y el consentimiento informado. Además, el proyecto ha sido aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad del País Vasco, velando por el cumplimiento de los valores democráticos, la equidad y la no discriminación durante el desarrollo de la investigación, como ya se ha mencionado anteriormente.

### H.3. Igualdad de Género y No Discriminación

En el marco de este estudio, se ha respetado la igualdad de oportunidades y la no discriminación por razón de género, ya que se ha involucrado deportistas de Crossfit independientemente de su sexo. Como ya se ha visto, los criterios de inclusión de los participantes no establecen diferencias en función del sexo, permitiendo una distribución equitativa de hombres y mujeres en los grupos de intervención. Igualmente, el reclutamiento de los sujetos y la recopilación de datos se han realizado de forma imparcial, sin sesgos ni preferencias de género establecidas. De esta forma, se asegura que los resultados obtenidos reflejen de manera justa y representativa a la población de deportistas de Crossfit, sin ningún sesgo por razón de género.

#### H.4. Accesibilidad Universal

Aunque es cierto que este Trabajo de Fin de Grado no aborda directamente aspectos relacionados con la accesibilidad universal, cabe destacar que los futuros desarrollos y aplicaciones derivados de esta investigación deberán considerar la inclusión y la accesibilidad como principios fundamentales a tener en cuenta. En el contexto de la práctica deportiva y la suplementación nutricional, es de vital importancia garantizar que las intervenciones y recomendaciones sean accesibles y adaptables a las necesidades de todos los individuos, sin tener en cuenta por ejemplo sus capacidades cognitivas, sensoriales o físicas.

#### H.5. Sostenibilidad y Cambio Climático

Con respecto a la sostenibilidad, este estudio presenta implicaciones relevantes. La práctica del Crossfit, al ser una disciplina que combina ejercicios de alta intensidad y corta duración, se caracteriza por un elevado gasto energético y, en consecuencia, un mayor consumo de recursos. Con este enfoque, la investigación de estrategias nutricionales como en este caso, la suplementación con probióticos, puede contribuir a mejorar la eficiencia y la recuperación de los atletas, mejorando de este modo el uso de recursos y reduciendo en cierto modo el impacto ambiental que puede conllevar la práctica deportiva. De igual modo, este ensayo puede aportar conocimientos para comprender de mejor manera los mecanismos fisiológicos implicados en la adaptación al ejercicio físico intenso, lo que a su vez, permite desarrollar

estrategias de entrenamiento y recuperación más sostenibles, que permitan a los atletas alcanzar un alto rendimiento sin comprometer su salud a largo plazo.

#### H.6. Reflexión Personal

A lo largo de todo el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado, he tenido la oportunidad de adquirir y aplicar competencias variadas en relación con la sostenibilidad y la responsabilidad social.

En primer lugar, he considerado los aspectos éticos y de derechos humanos en el diseño y ejecución de la investigación, puesto que utiliza seres humanos como sujetos.

Asimismo, me he concienciado de la necesidad de promover la igualdad de género y la no discriminación en todos los ámbitos, como es en este caso en el de la investigación científica. La inclusión independientemente del sexo y la adopción de un enfoque imparcial en la recopilación y análisis de datos, me han servido para conocer como todas estas cuestiones afectan en el desarrollo de una ciencia más justa e inclusiva.

Aunque este trabajo no aborda directamente la accesibilidad universal como ya se ha comentado, he reflexionado sobre la importancia de considerarla para futuras aplicaciones y desarrollos basados en la investigación.

Por último, en relación con la sostenibilidad y el cambio climático, este estudio me ha concienciado acerca de la necesidad de buscar soluciones que puedan optimizar el uso de recursos y puedan reducir el impacto ambiental que conlleva la práctica deportiva, Las investigaciones de estrategias nutricionales, como este Trabajo de Fin de Grado, pueden contribuir a este fin, mejorando la eficiencia y recuperación de los atletas.

## Bibliografía

- [1] Agilent. Microplate data analysis software, biotek plate readers | agilent. https://www.agilent.com/en/product/microplate-instrumentation-control-analysis-software/imager-reader-control-analysis-software/biotek-gen5-software-for-detection-1623227. (Accessed on 06/13/2024).
- [2] Abigail Benítez-Estrada, Javier Villanueva-Sánchez, Guillermina González-Rosendo, Víctor Eduardo Alcántar-Rodríguez, Rubén Puga-Díaz, and Adrián Guillermo Quintero-Gutiérrez. Determination of the total antioxidant capacity of food and human plasma by photo-chemiluminescence: Correlation with spectrophotometric (frap) and fluorometric (orac) assays. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 23(1):1–9, 2020.
- [3] Jesús Aguilar Diaz De Leon and Chad R Borges. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *JoVE* (*Journal of Visualized Experiments*), (159):e61122, 2020.
- [4] Boletín Oficial del Estado. Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. BOE de, 15(11):2002, 2002.
- [5] Boletín Oficial del Estado. Ley orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales. BOE de, 15(11):70, 2018.

30 Bibliografía

[6] DeNovix. Espectrofotómetro denovix ds-11 frente a thermo fisher nanodrop<sup>TM</sup> one. https://www.denovix.com/ds-11-fx-spectrophotometer-fluorometers-compared-nanodrop-one/. (Accessed on 06/14/2024).

- [7] Laura Andrea Denzoin Vulcano, Alejandro Luis Soraci, and Maria Ofelia Tapia. Homeostasis del glutatión. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 47(3):0–0, 2013.
- [8] Verónica Irazusta, Armando Moreno-Cermeño, Joaquim Ros, and Jordi Tamarit. Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. 2008.
- [9] Thermo Scientific. 3091-nanodrop-one-user-guide-v1.3-sw-spanish.pdf (protegido). https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf. (Accessed on 06/14/2024).
- [10] Statgraphics. Download statgraphics centurion 19. https://www.statgraphics.com/download19. (Accessed on 06/13/2024).
- [11] Talent. Salario para biólogo en españa salario medio. https://es.talent.com/salary?job=bi%C3%B3logo. (Accessed on 06/13/2024).
- [12] Wikipedia. Microsoft excel wikipedia, la enciclopedia libre. https://es.wikipedia.org/wiki/Microsoft\_Excel. (Accessed on 06/13/2024).
- [13] Wikipedia. Método de bradford wikipedia, la enciclopedia libre. https://es.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9todo\_de\_Bradford. (Accessed on 06/14/2024).