

# LIMOSILACTOBACILLUS VAGINALIS BC17 – NUOVE FUNZIONALITA' E SVILUPPO FORMULATIVO

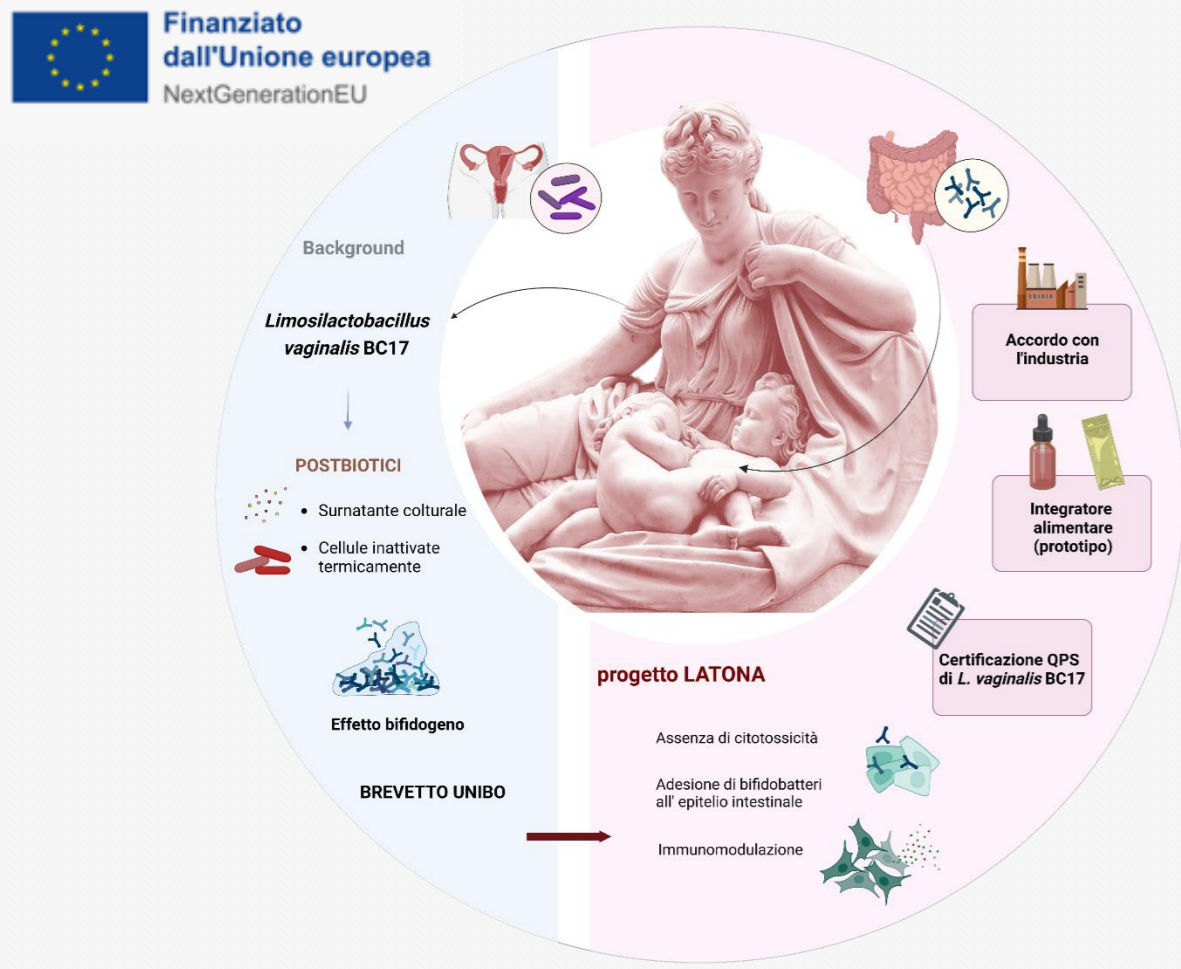
Federica Monti<sup>1</sup>, Barbara Giordani<sup>1</sup>, Elisa Corazza<sup>1</sup>, Angela Abruzzo<sup>1</sup>, Carola Parolin<sup>1</sup>, Claudio Foschi<sup>2,3</sup>, Antonella Marangoni<sup>2</sup>, Barbara Luppi<sup>1</sup> e Beatrice Vitali<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, 40126 Bologna;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna, 40138 Bologna;

<sup>3</sup>Unità di IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, 40138 Bologna

## Introduzione



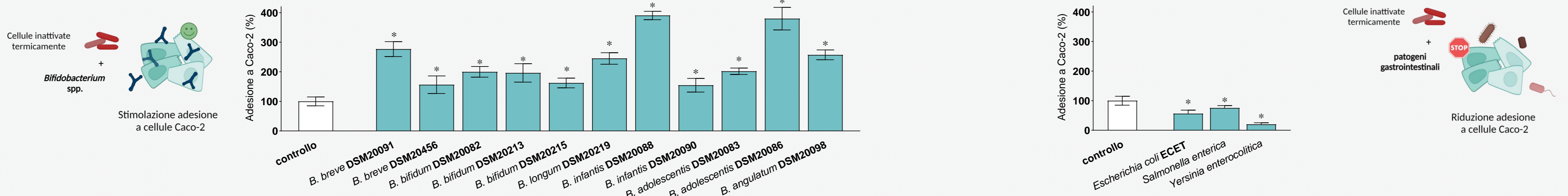
La scoperta della presenza della specie *Limosilactobacillus vaginalis* nel latte materno [1] e la dimostrazione dell'**attività bifidogena** e della **sicurezza** del ceppo *L. vaginalis* BC17 [2, 3], aprono la prospettiva di utilizzo delle cellule vitali e/o dei **postbiotici** di questo ceppo come **agenti bioterapeutici**. L'obiettivo è la stimolazione e la colonizzazione dei bifidobatteri sia in un **generico soggetto umano** che in **bambini** nati con parto cesareo e/o allattati con formula, nei quali la carenza di bifidobatteri dovuta alla modalità di parto/allattamento può avere ripercussioni sulla salute intestinale e immunitaria.

## Scopo dello studio

In questo studio, è stata approfondita la caratterizzazione funzionale delle **cellule inattivate (CI)** di *Limosilactobacillus vaginalis* BC17 ed è stato sviluppato un prototipo di formulazione adatto alla somministrazione del postbiotico negli adulti e nei bambini. In particolare, è stata valutata la capacità di modulare l'adesione di bifidobatteri e di patogeni gastrointestinali su cellule Caco-2, e sono stati studiati la possibile attività antinfiammatoria e l'impatto nei confronti di cellule intestinali. Infine, è stata realizzata e caratterizzata una formulazione orale liquida che a seconda della viscosità può essere somministrata come gocce multidosate nei bambini oppure come dose unica mediante stick pack negli adulti.

## Adesione alle cellule intestinali

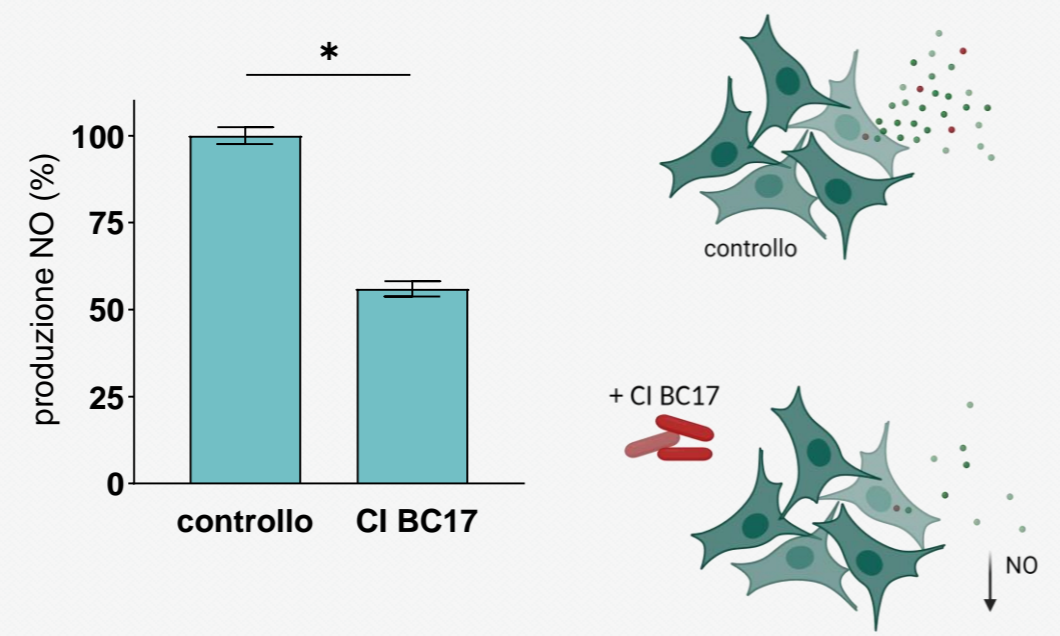
Le cellule intestinali **Caco-2** sono state usate come modello per studiare l'impatto di BC17 inattivato termicamente sull'adesione di bifidobatteri ed enteropatogeni utilizzando la colorazione di May-Grundwald Giemsa. Le CI di BC17 sono in grado di **favorire selettivamente l'adesione di specie health-promoting di bifidobatteri** (fino a +290%). Le CI di BC17 sono in grado di fornire al contempo protezione dall'adesione di specie virulente come *Yersinia enterocolitica* (riduzione dell'80%).



## Attività antinfiammatoria

L'**attività antinfiammatoria** è stata valutata in termini di riduzione della produzione di ossido nitrico (NO) in macrofagi (RAW264.7) stimolati con LPS.

BC17 inattivato termicamente **riduce del 40% la produzione di NO**, indicando un suo possibile impiego anche in condizioni di disbiosi associate a processi infiammatori.

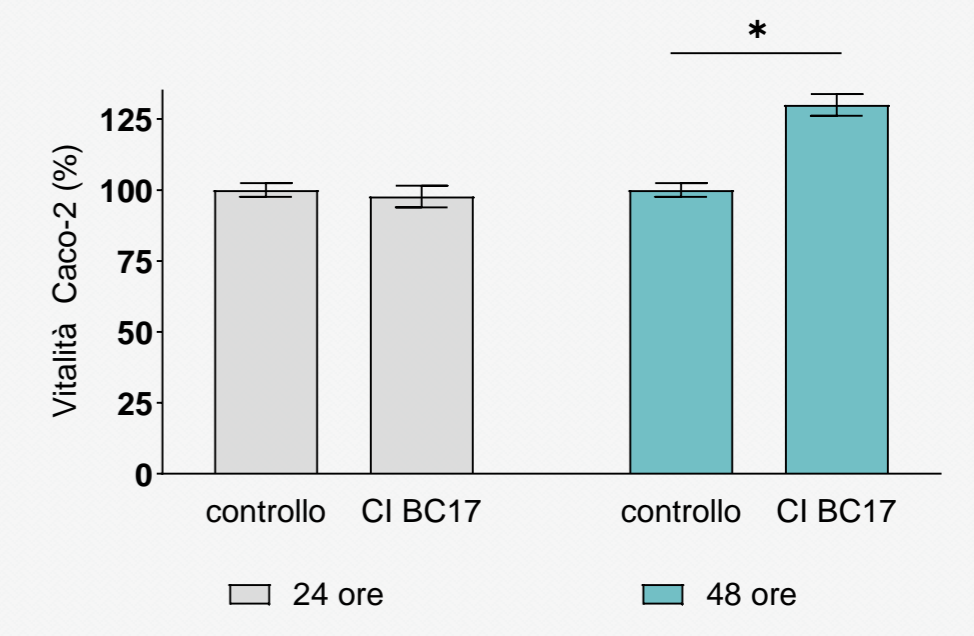


## Sicurezza

L'**assenza di citotossicità** è un parametro fondamentale per un bioterapico. L'impatto di BC17 inattivato termicamente sulla vitalità delle cellule Caco-2 è stato valutato mediante saggio MTT.

Non sono stati osservati effetti citotossici. Al contrario, dopo 48 ore di incubazione la vitalità cellulare in presenza delle CI è favorita (+20%).

Tutti i risultati sono riportati in percentuale rispetto al controllo non trattato con le CI di BC17 (media ± DS). \* P < 0.05



## Realizzazione della formulazione liquida

Per la realizzazione della **formulazione liquida a base acquosa**, si è scelto di valutare l'impiego di **gomma xantano** (GX) a diverse concentrazioni (0.25%, 0.50% e 0.75%) al fine di ottenere una **viscosità** paragonabile a quella di prodotti in commercio (PC). La composizione è stata poi arricchita con **edulcorante** (sorbitolo) e **aromi naturali** (limone e fragola) per migliorare le caratteristiche organolettiche e con **conservanti ad uso alimentare** (potassio sorbato e sodio benzoato) per preservare il prodotto dall'inquinamento microbico.

	Viscosità cP (n=3)		GOCCE	STICK-PACK
GX0.25% + eccipienti	17.6 ± 0.1		acqua depurata	77.90%
GX0.50% + eccipienti	88.4 ± 3.0		sorbitolo	20.00%
GX0.75% + eccipienti	996.6 ± 8.2		gomma xantano	0.25%
PC 1 (Seki gocce)	6.3 ± 0.2		<i>L. vaginalis</i> BC17	1.50%
PC 2 (Riopan stick-pack)	51.8 ± 1.9		sodio benzoato	0.15%
PC 3 (Gaviscon stick-pack)	537.70 ± 9.5		potassio sorbato	0.15%
			aroma fragola	0.05%
			aroma limone	0.05%

## Caratteristiche tecnologiche ed organolettiche

TEMPO	Densità g/cm <sup>3</sup>	Viscosità cP (n=3)	pH	
				FRAGOLA/LIMONE
GOCCE	1.080	17.9 ± 0.3	5.5-6.0	DOLCE
STICK-PACK	1.075	101.8 ± 2.4	5.5-6.0	AVORIO
				LATTESCENTE

## Studi di stabilità

Studi di **stabilità accelerata** (-10°C per 24 ore, +25°C per 24 ore, +45°C per 24 ore) e di **sedimentazione** hanno dimostrato che le caratteristiche tecnologiche ed organolettiche vengono mantenute quando il prodotto è confezionato in flaconcini in vetro ambrato con contagocce e in stick-pack di alluminio. Studi di **stabilità a lungo termine** sono ancora in corso: dopo un mese di conservazione a 25°C le formulazioni risultano stabili e rispondono ai requisiti di **qualità microbiologica** delle preparazioni acquose per uso orale (Tabella 5.1.4.-1 della FUI XII ed.), dimostrando l'efficacia del sistema preservante.

-10°C PER 24 ORE, +25°C PER 24 ORE, +45°C PER 24 ORE

	Densità g/cm <sup>3</sup>	Viscosità cP (n=3)	pH
GOCCE	1.094	19.3 ± 0.2	5.5-6.0
STICK-PACK	1.091	103.1 ± 0.7	5.5-6.0

CENTRIFUGA (3750 RPM PER 5 ORE A 25°C)

	Sedimento	Densità g/cm <sup>3</sup>	Viscosità cP (n=3)	pH
GOCCE	Si, di facile risospensione	1.033	19.9 ± 0.3	5.5-6.0
STICK-PACK	No	1.086	108.9 ± 2.4	5.5-6.0

DOPO 1 MESE A 25°C

	Densità g/cm <sup>3</sup>	Viscosità cP (n=3)	pH
GOCCE	1.060	16.8 ± 0.2	5.5-6.0
STICK-PACK	1.065	103.7 ± 1.0	5.5-6.0

CONTROLLO MICROBIOLOGICO

	Batteri aerobi cfu/mL	Lieviti e muffe cfu/mL	<i>E. coli</i> e coliformi
GOCCE	0.2 × 10 <sup>2</sup>	1.7 × 10 <sup>1</sup>	Assenti
STICK-PACK	0.6 × 10 <sup>2</sup>	1.8 × 10 <sup>1</sup>	Assenti
GOCCE	0.5 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>1</sup>	Assenti
STICK-PACK	0.4 × 10 <sup>2</sup>	1.3 × 10 <sup>1</sup>	Assenti

## Conclusioni

In conclusione, le CI di *L. vaginalis* BC17 hanno mostrato eccellenti caratteristiche prebiotiche e possono essere veicolate in modo versatile in una formulazione liquida facilmente scalabile a livello industriale da sfruttare sia per la somministrazione negli adulti che nei bambini.

**Fondi:** Progetto AlmaValue Latona, finanziato dall'Unione Europea - NextGenerationEU

**Ringraziamenti:** si ringrazia l'azienda Farmalabor per i flaconcini in vetro ambrato con contagocce e l'azienda OmagPack per gli stick-pack di alluminio.

## Bibliografia

- [1] A new probiotic candidate bacterium from human milk: *Limosilactobacillus vaginalis* MA-10. M. Asan-Ozusaglam and A. Gunyak-ti. Acta Alimentaria 2021, 50, 13–21.
- [2] Prebiotic activity of vaginal lactobacilli on bifidobacteria: from concept to formulation. Giordani et al. Microbiol Spectr 202, 10.1128/spectrum.02009-22.
- [3] *Limosilactobacillus vaginalis* promotes bifidobacteria colonization: a novel postbiotic strategy for shaping the infant gut micro-biota. Giordani et al. Nutrients 2023, 15, 4433.