

Articolo

Il Fitocomplesso del *Fucus vesiculosus* e dell'*Ascophyllum nodosum* controlla i livelli di glicemia post-prandiale nel plasma: uno studio in vitro ed in vivo in un modello murino di NASH

Daniela Gabbia ¹, Stefano Dall'Acqua ¹, Iole Maria Di Gangi ², Sara Bogialli ²,
Valentina Caputi ¹, Laura Albertoni ³, Iaria Marsilio ¹, Nicola Paccagnella ¹, Maria Carrara ¹,
Maria Cecilia Giron ¹ e Sara De Martin ^{1*}

¹ Facoltà di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova, 35131 Padova, Italia; daniela.gabbia@gmail.com (D.G.); stefano.dallacqua@unipd.it (S.D.A.); valekap@gmail.com (V.C.); ilaria.marsilio@gmail.com (I.M.); nicolapaccagnella89@gmail.com (N.P.); maria.carrara@unipd.it (M.C.); ceci.giron@gmail.com (M.C.G.)

² Facoltà di Scienze Chimiche, Università di Padova, 35131 Padova, Italia; iolemaria.digangi@unipd.it (I.M.D.G.); sara.bogialli@unipd.it (S.B.)

³ Facoltà di Medicina, Patologia Generale e Citopatologia, Università di Padova, 35128 Padova, Italia; aoichan@libero.it

* Corrispondenza: sara.demartin@unipd.it; Tel.: +39-049-827-5776; Fax: +39-049-827-5093

Redattore Accademico: Paul Long

Ricevuto: 21 ottobre 2016; Approvato: 9 febbraio 2017; Pubblicato: 15 febbraio 2017

Riassunto: Sin dall'antichità, le comunità costiere asiatiche consumano alghe commestibili. Gli estratti di *Fucus vesiculosus* e di *Ascophyllum nodosum* sono utilizzati tradizionalmente per curare l'obesità e diversi disturbi gastrointestinali. Abbiamo analizzato la capacità degli estratti ottenuti dalle suddette alghe di inibire gli enzimi digestivi α -amilasi ed α -glucosidasi in vitro e di controllare i livelli di glicemia post-prandiale nel plasma in un modello murino di steatoepatite non alcolica (NASH), una malattia del fegato che precede spesso la comparsa del diabete di Tipo 2 (T2DM). Questo modello è stato ottenuto tramite la somministrazione di una dieta ad elevato contenuto di grassi. I nostri risultati dimostrano che tali alghe hanno solamente ritardato e ridotto il picco glicemico nel sangue ($p < 0,05$) dei topi alimentati con una normale dieta, senza modificare l'area che si trova sotto la curva glicemica (AUC). Nel modello di NASH, il fitocomplesso è stato in grado di ridurre sia il picco glicemico postprandiale, sia l'AUC. La somministrazione dell'estratto in una dieta particolarmente ricca di grassi è associata ad una digestione lenta dei carboidrati, ma anche ad una minore assimilazione di questi ultimi. In conclusione, i risultati da noi ottenuti indicano che il presente estratto di alghe può essere utile nel controllo della digestione e dell'assorbimento dei carboidrati. Tale effetto può essere sfruttato da un punto di vista terapeutico per prevenire la trasformazione della NASH in T2DM.

Parole chiave: *Ascophyllum nodosum*; *Fucus vesiculosus*; steatoepatite non alcolica; livello della glicemia post-prandiale

1. Introduzione

Sin dall'alba dei tempi, soprattutto in Asia, le comunità costiere probabilmente si sono nutrite con alghe commestibili, un alimento facilmente reperibile [1]. È risaputo che le alghe ed i loro estratti organici contengono diversi polisaccaridi bioattivi che portano numerosi benefici per la salute [2–8]. Tali polisaccaridi non possono essere digeriti completamente dall'apparato digerente umano e rappresentano una fonte di fibre alimentari, prebiotici ed altri ingredienti funzionali [9,10]. Le fibre solubili possono rallentare la digestione e l'assorbimento delle sostanze nutritive incrementando la viscosità, diminuendo così i livelli glicemici

ed il colesterolo presenti nel sangue [10]. Sulla base di tali osservazioni, è stato riportato che l'assunzione di fibre ricavate da alghe è correlata ad una riduzione significativa di malattie croniche quali diabete, obesità ed ipertensione [11,12]. Studi recenti hanno constatato che il fucoidano, un polisaccaride solfato individuato in molteplici specie di alghe marroni ed alghe marine, possiede numerose proprietà biologiche e farmacologiche, tra cui effetti antiproliferativi, antinfiammatori ed antivirali [13,14]. Gli estratti di alga sono considerati un'ottima fonte di inibitori degli enzimi digestivi. In particolare, contengono composti polifenolici come i bromofenoli [15,16] ed i flortannini (PHT) [5,17] che sono noti per essere inibitori degli α -glicosidasi. L'enzima α -glicosidasi, insieme all' α -amilasi, è l'enzima fondamentale per la rottura e l'assorbimento degli amidi. L' α -amilasi è secreta dal pancreas e dalle ghiandole salivari [4] e catalizza la scissione dei legami α -D-(1-4) glicosidici di amidi, amilosio, amilopectina, glicogeno e diverse maltodestrine in oligosaccaridi più piccoli, quali maltosio e glucosio [18,19]. L' α -glucosidasi, che si trova nella membrana superficiale con orletto a spazzola delle cellule intestinali, avvia la fase finale del processo digestivo catalizzando l'idrolisi dei carboidrati complessi e dei disaccaridi in monosaccaridi assorbibili, ad esempio, il glucosio rilasciato dal maltosio e/o saccarosio [20]. È stato notato che l'inibizione dell' α -amilasi e dell' α -glucosidasi può ridurre significativamente l'aumento della glicemia nel sangue dopo un pasto a base di carboidrati misti, ritardando l'assorbimento del glucosio [21]. Nei pazienti affetti da Diabete di Tipo 2 (T2DM), tale approccio è risultato essere più efficace rispetto al controllo della secrezione dell'insulina, dal momento che è economico, idoneo e previene potenzialmente le reazioni avverse ai farmaci [22].

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e la sua relativa complicazione, la steatoepatite non alcolica (NASH), sono diventate le cause più comuni di malattie epatiche croniche nei Paesi occidentali, causando una notevole morbilità e mortalità correlate al fegato [23]. Le prove hanno constatato che la NAFLD può precedere lo sviluppo del T2DM [24], poiché il segno caratteristico di questa condizione epatica è l'insulino-resistenza che è fortemente associata al T2DM ed all'obesità addominale [24]. Si stima che il sottogruppo della NAFLD, pazienti che soffrono di NASH, sia pari a circa il 15% della popolazione europea [25] e della popolazione statunitense [26]. I pazienti affetti da NASH rischiano maggiormente di sviluppare malattie epatiche progressive e relativa morbilità. Strano a dirsi, la predominanza della NASH aumenta significativamente nelle popolazioni soggette ad alto rischio, dato che la NASH è presente nel 25%–30% dei pazienti affetti da obesità o T2DM ed in più del 35% dei pazienti gravemente obesi che presentano T2DM [27–29].

Nel presente studio abbiamo analizzato in vitro l'attività inibitoria sugli enzimi digestivi α -amilasi e α -glucosidasi di un estratto disponibile sul mercato di *Ascophyllum nodosum* (egg wrack) e *Fucus vesiculosus* (bladder wrack). In seguito, ne abbiamo studiato gli effetti sui livelli della glicemia nel sangue dopo l'ingestione di amidi in un modello murino di NASH, ottenuto tramite la somministrazione di una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD) per cinque settimane [30,31]. Dal momento che la NASH è spesso associata all'insulino-resistenza ed al T2DM, il presente studio ambiva a verificare l'eventuale utilità degli estratti di alga per il controllo glicemico in tale condizione epatica.

2. Materiali e Metodi

2.1. Sostanze Chimiche e Reagenti

L'estratto di alga disponibile sul mercato con il nome commerciale di Gdue™ (N. Lotto 201400566) è stato fornito da Aesculapius (Brescia, Italia). L'estratto è stato ricavato dal tallo essiccato di *Ascophyllum nodosum* e di *Fucus vesiculosus* tramite un processo esclusivo di estrazione con acqua calda, seguito da una serie di processi di filtrazione ed ultrafiltrazione e completato con un'essiccazione a spruzzo. Durante il processo sono stati rimossi gli alginati e parte dei sali. L'estratto corrispondeva all'estratto di un'intera pianta contenente i polifenoli della pianta (35,5% come indicato nel certificato dell'analisi del prodotto commerciale) unitamente ai polisaccaridi algali (fibre) ed ai minerali (contenuto di iodio <300mg/kg).

L'amido di patate, l'idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4), il diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4), il tartrato di sodio e potassio, l'idrossido di sodio (NaOH), il cloruro di sodio (NaCl), il glutatione, l' α -amilasi umana salivare, α -glucosidasi, l'acarbiosio, il p-nitrofenil- α -D-glucopiranoside (PNP-Gluc) e l'acido dinitrosalicilico (DNS) sono stati ottenuti da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Analisi NMR, HPLC-DAD e GC-MS

Per il profilo genetico dell'estratto, sono stati acquisiti gli spettri $^1\text{H-NMR}$ con l'ausilio di uno spettrometro Bruker Avance III (Billerica, MA, USA) da 400 MHz. I campioni (100 mg) sono stati pesati ed estratti con 1 mL di solvente (metanolo deuterato oppure acqua deuterata) in un bagno ad ultrasuoni, per 10 minuti. Gli stessi sono poi stati sottoposti a centrifuga (13.000 rpm) ed il surnatante è stato trasferito in un tubo per NMR per la misurazione.

Per l'analisi dei polisaccaridi è stato utilizzato come fase stazionaria un Tosohaas 5000 9.4×300 mm. La rilevazione dei polisaccaridi è stata effettuata con un Rivelatore Evaporativo a Luce Diffusa (Agilent, Santa Clara, CA, USA) mentre è stato utilizzato un rivelatore a serie di diodi per osservare l'assorbimento a 280 nm e lo spettro UV. L'eluizione è stata ricavata utilizzando una miscela di 10 mM di acqua e di formiato di ammonio con 1% di acetonitrile. La velocità di flusso è stata stabilita ad 1 mL/min. Per creare una calibrazione tra il peso molecolare ed i tempi di ritenzione sono stati utilizzati differenti destrani (1000, 5000, 80.000, 150.000 Da). La comparazione dei tempi di ritenzione con i destrani standard ha permesso di stimare il peso molecolare della frazione di polisaccaridi.

L'analisi GC-MS degli acidi grassi è stata eseguita con uno strumento TRACE DSQ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) con una colonna cromatografica DB5 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$) ed una velocità di flusso del gas elio di 1,2 mL/min. La separazione cromatografica è stata effettuata secondo il seguente programma: 100°C per 4 min, un aumento di $10^\circ\text{C}/\text{min}$ fino a 200°C seguito da un incremento di $4^\circ\text{C}/\text{min}$ fino a 260°C . Il campione algale è stato derivatizzato per individuare la presenza di esteri metilici di acidi grassi e per confrontarlo con standard metilati.

2.3. Analisi dell'attività dell' α -Amilasi

La valutazione dell'attività dell' α -amilasi è stata eseguita tramite un'analisi dell'acido 3,5-dinitrosalicilico (DNS), come descritto da Roy et al. [32]. L'amido delle patate è stato solubilizzato bollendo una soluzione all'1% per 15 min in 20 mM di fosfato di sodio (pH 6,9) contenente 6,7 mM NaCl. L'analisi è stata svolta a 20°C per 5 min in un volume finale di 2,1 mL con α -amilasi ($0,83 \mu\text{g}/\text{mL}$) ed amido solubile ($47,6 \mu\text{g}/\text{mL}$). L'effetto inibitore è stato misurato prima dell'analisi incubando 1 mL di substrato con 100 μL di soluzione di estratto di alghe a 20°C per 10 min. La reazione è stata interrotta aggiungendo 1 mL di reagente DNS e facendo bollire per 15 min. Dopo aver aggiunto 9 mL di acqua, l'assorbanza rilevata era pari a 540 nm, L'attività inibitoria è stata calcolata attraverso la seguente formula:

$$\% \text{ Inibizione} = \frac{A_{540\text{Controllo}} - A_{540\text{Test}}}{A_{540\text{Controllo}}} \times 100$$

2.4. Analisi dell'attività dell' α -Glucosidasi

L'attività dell' α -Glucosidasi è stata misurata come la quantità di p-nitrofenolo rilasciato dal PNP-Gluc [33]. La reazione è stata svolta a 37°C per 20 min in 57 mM di tampone fosfato salino (pH 6,8), contenente 0,1 mM di glutatione, 0,85 mM di p-nitrofenilpiranoside (PNP)-Gluc e 0,2 U di α -glucosidasi. La reazione è stata interrotta aggiungendo 100 mM di carbonato di sodio. L'effetto inibitore è stato misurato attuando la reazione in presenza di 100 μL di estratto di alghe o 100 μL di acqua (controllo). La produzione di p-nitrofenolo è stata quantificata misurando l'assorbanza a 400 nm e la percentuale inibitoria è stata calcolata con la seguente formula:

$$\% \text{ Inibizione} = \frac{A_{400\text{Controllo}} - A_{400\text{Test}}}{A_{400\text{Controllo}}} \times 100$$

2.5. Animali e Trattamenti

Tutti i protocolli sperimentali sono stati realizzati previa autorizzazione del Comitato Etico per la Cura e la Sperimentazione Animale dell'Università di Padova e del Ministero Italiano della Salute (n. 80/2011-B, 29 aprile 2011) nel rispetto delle linee guida nazionali ed europee per la gestione e l'utilizzo di animali sperimentali.

La presente ricerca è stata svolta con 60 topi C57BL/6J (di 8 ± 2 settimane; Charles River Laboratories, Calco (Lecco), Italia) che sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali in maniera casuale: uno sottoposto ad una dieta regolare e l'altro ad una dieta ad alto contenuto di grassi (60/Grassi, kcal da: 23,5% proteine, 18,4% carboidrati; 60,3% grassi; Harlan Laboratories, Lesmo (Monza Brianza) Italia) per 35 giorni. I topi hanno avuto accesso al cibo ed all'acqua ad libitum, hanno vissuto ad una temperatura di 22°C con un ciclo luce/buio di 12 h e sono stati divisi in quattro esemplari per gabbia, nella stessa stanza, dallo stesso personale. Il peso corporeo è stato misurato una volta a settimana. Al 35° giorno a tutti i topi è stata somministrata con sonda gastrica una soluzione oleosa (2 mL/kg·bw) composta 50%–50% da amido (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e cartamo. Ogni gruppo (con dieta regolare e ad alto contenuto di grassi) è stato suddiviso in due sottogruppi: uno con la funzione di controllo e l'altro trattato con l'estratto di alghe dissolto nella soluzione di amido per raggiungere una concentrazione di 7,5 mg/kg·bw. I livelli di glicemia nel sangue sono stati rilevati 30, 60, 120 e 180 min dopo la somministrazione con sonda gastrica. I livelli d'insulina sono stati misurati 0, 30, 60 e 180 min dopo la somministrazione con sonda gastrica tramite un kit ELISA (EMD Millipore, Darmstadt, Germania), seguendo le indicazioni del produttore.

2.6. Analisi istologica

Per valutare la presenza di fibrosi e/o steatosi sono state effettuate delle analisi istologiche su campioni di tessuto epatico fissati in formaldeide 4% ed immersi nella paraffina. Le sezioni da cinque micrometri sono state sottoposte a colorazione con ematossilina eosina ed acido picrico-fucsina acida (Colorazione di Van Gieson), secondo le tecniche standard. Tutti gli esami istologici del tessuto epatico sono stati realizzati dallo stesso osservatore a cui non è stata comunicata alcuna informazione sul topo. Le immagini sono state ricavate tramite un microscopio Leica DM LB2 dotato di fotocamera Leica DFC280 (Wetzlar, Germania).

2.7. Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state svolte utilizzando il software GraphPad Prism, versione 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Salvo diversa indicazione, i dati sono presentati come valori medi \pm l'errore standard della media (S.E.M.). Si è proceduto ad una comparazione dei dati sperimentali ottenuti nei diversi gruppi attraverso un'analisi unilaterale della varianza (ANOVA), seguita dal test *post-hoc* di Newman-Keuls o dal test *t* di Student, se adatto. Il test *t* di Student è stato utilizzato anche per confrontare i risultati ricavati dagli esemplari di controllo e dagli animali trattati con estratto di alga. Il valore $p < 0,05$ è stato ritenuto statisticamente significativo.

3. Risultati

3.1. Caratterizzazione dell'estratto di Alghe

Come prima fase della profilatura dei costituenti presenti nell'estratto di alghe è stato utilizzato $^1\text{H-NMR}$. Due campioni sono stati preparati con metanolo deuterato (MeOD) ed acqua deuterata (D_2O). Il $^1\text{H-NMR}$ dell'estratto in MeOD (Immagine S1) ha mostrato la presenza di segnali nel range di δ 0,85–5,00 ppm. Non sono stati individuati segnali nell'ambito ascrivibile ai protoni aromatici, rafforzando così l'argomentazione secondo cui sono presenti esigue quantità di composti aromatici che portano gli atomi di idrogeno o che tali costituenti non siano solubili nel metanolo. Ulteriori segnali nella regione alifatica sostengono la presenza di derivati degli acidi grassi, dovuta ad un ampio tripletto a δ 0,89 ppm attribuibile al gruppo metilico terminale, ampi multipletti a δ 1,29–1,33 ppm tipici del CH_2 alifatico e tripletti a δ 2,03 e 2,35 ppm che sono ascrivibili rispettivamente al vicino doppio legame di CH_2 ed alla funzione carbonilica. Ulteriori segnali a δ 5,14 e 5,35 ppm possono sostenere la presenza di legami doppi nella catena degli acidi grassi. Un singoletto a δ 2,16 ppm può essere assegnato al gruppo acetil-metilico. Altri segnali nello spettro possono rivelare anche la presenza di residui zuccherini, ovvero i multipletti a δ 3,50–3,80 ppm ed il doppio dei doppietti a δ 4,16–4,35 ppm che possono essere attribuiti al CH_2 di glicerolo. È possibile individuare segnali ascrivibili alla presenza dell'etanolo come il quartetto a δ 2,33 ppm ed il tripletto a δ 1,18 ppm, presentati come una quantità relativa di 2:3.

Il $^1\text{H-NMR}$ dissolto in D_2O ha mostrato solo segnali nel range di δ 3,50–3,90 ppm, essendo attribuibili ad oligosaccaridi o porzioni zuccherine (Immagine S2). Due piccoli singoletti a δ 8,40 e 6,45 ppm sono visibili nello spettro dopo la soppressione dell'acqua con presaturazione. Inoltre, è possibile identificare ampi segnali nel range δ 6,00–6,35 ppm che possono essere collegati ai protoni fenolici. Un precedente studio indica che i segnali nel $^1\text{H-NMR}$ dei florotannini sono singoletti nel range di δ 6,00–6,50 ppm [34]. Nella regione alifatica è possibile rilevare segnali minori, ovvero un ampio picco indefinito a 1,25 ppm, due singoletti a 1,88 e 2,18 ppm ed alcuni multipletti a δ 2,00–2,10 ppm. Rispetto alla regione degli zuccheri, il numero di tali segnali è scarso, come è chiaramente visibile nell'Immagine S2. Pertanto, l'analisi NMR ci ha permesso di osservare che l'estratto è composto principalmente da derivati dei saccaridi e contiene derivati del floroglucanolo. L'HPLC a permeazione di gel ha rivelato la presenza di una vasta distribuzione di pesi molecolari per i derivati dei carboidrati (Immagine S3), mostrando l'esistenza di una notevole quantità di piccoli saccaridi (mono e disaccaridi), così come polisaccaridi estesi, in un range di peso molecolare stimato tra i 50.000 e i 150.000 Da. Inoltre, vi sono altri saccaridi con pesi molecolari superiori a 150.000. Da.

La presenza di un elevato numero di acidi grassi nell'estratto, suggerita da $^1\text{H-NMR}$, è stata confermata dall'analisi GC-MS (Tabella 1). Nell'Immagine S4 è riportato un cromatogramma tipico di questa tipologia di analisi.

Tabella 1. Tempo di ritenzione degli esteri metilici degli acidi grassi ottenuti tramite l'analisi GC-MS.

Tempo di Ritenzione (min)	Esteri Metilici degli Acidi Grassi
13,75	Metile miristato
15,88	Metile esadecanoato
16,15	Metil palmitato
18,58	Metil linoleato
18,68	Metil oleato
19,09	Metil stearato
21,22	Metile arachidato

3.2. Studi In Vitro

La capacità dei componenti algali di inibire l' α -amilasi e l' α -glucosidasi è stata testata incubando tali enzimi con una crescente concentrazione di estratto di alghe (rispettivamente, 0,04–30 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$ e 0,016–2 $\mu\text{g/mL}$, $n = 9$). I nostri risultati hanno confermato sostanzialmente la precedente osservazione di Roy et al. [32], secondo cui l'estratto di alghe inibisce l'attività in vitro dei due enzimi in una maniera dose-dipendente. In particolare, l'Immagine 1 mostra come sia possibile raggiungere la totale inibizione delle attività dell' α -amilasi e dell' α -glucosidasi con una concentrazione di estratto algale pari a, rispettivamente, 30 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$. I valori IC_{50} sono riportati nella Tabella 2, a confronto con quelli dell'acarbosio, un inibitore standard. Come quanto presentato nella Tabella 2, le potenze inibitorie delle misture algali sui due enzimi digestivi sono superiori rispetto a quelle dell'acarbosio.

Tabella 2. Valori IC_{50} per l'attività d'inibizione dell' α -amilasi e dell' α -glucosidasi dell'estratto di alghe e dell'acarbosio, utilizzati come controlli positivi.

	Valore IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	α -Amilasi	α -Glucosidasi
Estratto di alghe	1,49 \pm 0,32	0,604 \pm 0,004
<u>Acarbosio</u>	<u>130,2 \pm 2,5</u>	<u>207,2 \pm 5,3</u>

I dati sono presentati come $\bar{x} \pm \text{DS}$ ($n = 6$). I risultati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato.

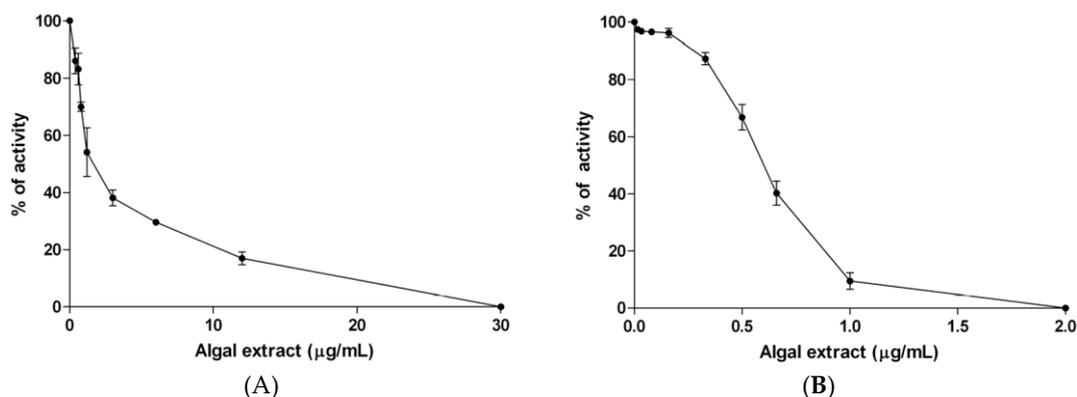


Immagine 1. Inibizione dose-dipendente dell'attività dell' α -amilasi (A) e dell' α -glucosidasi (B) da parte dell'estratto di alghe. I dati sono presentati come medie \pm SD ($n = 6$). I risultati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato.

3.3. Induzione della NASH

L'effetto dell'estratto di alghe sui livelli glicemici nel plasma è stato testato in vivo su topi sottoposti ad una dieta regolare o ad una dieta ad alto contenuto di grassi (topi HFD). Come illustrato chiaramente nell'Immagine 2, il peso dei topi HFD ha iniziato a crescere significativamente rispetto a quello dei topi alimentati con una dieta regolare dopo tre settimane di somministrazione della dieta ($p < 0,05$) ed è rimasto notevolmente elevato fino al giorno finale ($p < 0,01$).

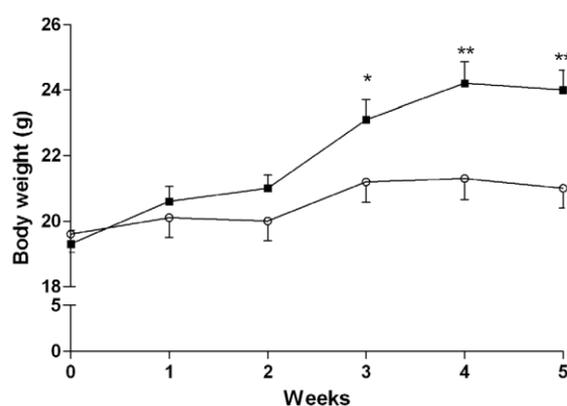


Immagine 2. Aumento del peso corporeo dei topi sottoposti ad una dieta regolare (\circ , $n = 30$) e ad una dieta ad alto contenuto di grassi (\square , $n = 30$). I dati sono presentati come medie \pm SD. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. topi trattati con dieta regolare, test t di Student per dati indipendenti.

L'immagine 3 mostra come i topi sottoposti ad una dieta regolare abbiano riportato una normale istologia epatica mentre i topi alimentati con HFD sono stati soggetti a steatosi, infiammazione lobulare e fibrosi periportale (punteggio di Ishak = 1-2), comprovando la presenza di NASH. È stato notato un significativo aumento nella deposizione di grasso addominale dopo cinque settimane di HFD ($3,12\% \pm 0,81\%$ vs. $1,18 \pm 0,41\%$ dei topi sottoposti a HFD vs. gruppo di controllo; $p < 0,01$) Non sono state registrate differenze significative per quanto riguarda l'emoglobina glicata, misurata negli animali appartenenti ai quattro gruppi (Dati non riportati).

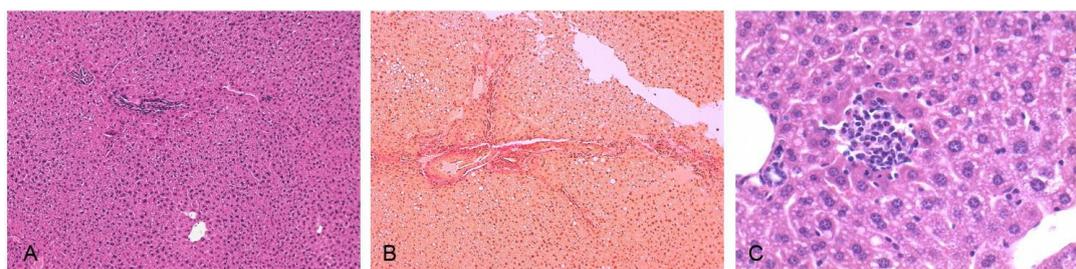


Immagine 3. Microfotografie rappresentative delle sezioni del fegato ricavate da un topo sottoposto ad una dieta regoalre (colorazione con ematossilina-eosina, (A) ingrandimento 10×) e da un topo alimentato secondo una dieta ad alto contenuto di grassi, sottoposte a colorazione con acido picrico-fucsina acida per individuare la fibrosi epatica ((B) ingrandimento 10×) o con ematossilina-eosina per identificare la steatosi epatica e la flogosi ((C) ingrandimento 40×).

3.4. Studi In Vivo

3.4.1. Topi sottoposti ad una dieta regolare

L'Immagine 4A mostra come una somministrazione per via orale di 7,5 mg/kg bw di estratto di alghe abbia ridotto l'aumento iniziale della glicemia presente nel sangue che solitamente viene osservato dopo un'alimentazione per via intragastrica a base di amidi (dopo 30 min, 197 ± 26 mg/dL vs. 156 ± 27 mg/dL rispettivamente nel gruppo di controllo e nei topi trattati con estratto di alghe; $p < 0,05$). Tra i due gruppi non sono state riscontrate differenze nei livelli glicemici del sangue dopo 60 e dopo 120 min, mentre i topi a cui è stato somministrato l'estratto di alghe presentavano livelli glicemici significativamente superiori ($p < 0,05$) 180 min dopo la sonda gastrica. I valori AUC_{0-180} medi erano sostanzialmente identici (rispettivamente 19.785 vs. 19.980 mg·min/dL nei topi trattati con l'estratto di alghe e negli esemplari di controllo).

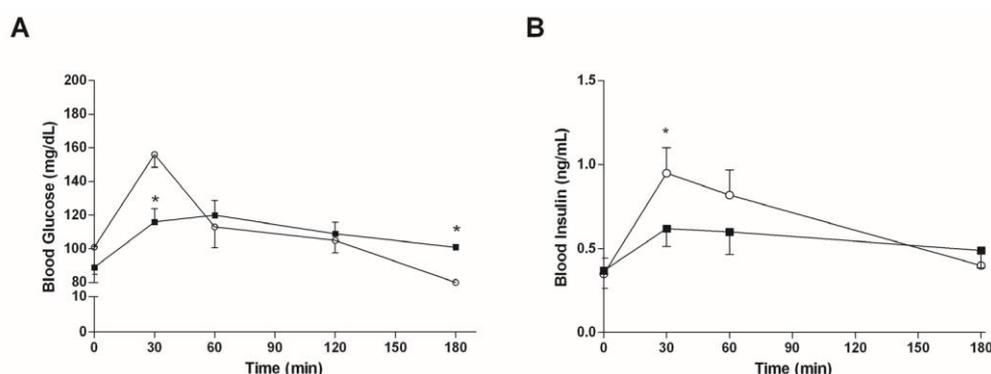


Immagine 4. Livelli di glicemia postprandiale nel plasma (A) e d'insulina nei topi sottoposti ad una dieta regolare e trattati con eccipiente (○, $n = 15$) o con 7,5 mg/kg bw di estratto algale (■, $n = 15$). I dati sono presentati come medie \pm SD.* $p < 0,05$ vs. topi trattati con eccipiente, test t di Student per dati indipendenti.

Le curve insulinemiche sono riportate nell'Immagine 4B. Il picco insulinico è stato raggiunto 30 min dopo la sonda gastrica ed è diminuito considerevolmente con la somministrazione dell'estratto di alghe. Di conseguenza, è stata riscontrata una riduzione nel valore AUC_{0-180} relativo per gli stessi topi (rispettivamente 98 vs. 199 ng·min/mL nei topi trattati con l'estratto di alghe e negli esemplari di controllo).

3.4.2. Topi sottoposti ad HFD

L'Immagine 5A mostra come un'assunzione orale di 7,5mg/kg bw di estratto algale abbia ridotto significativamente l'aumento nei livelli glicemici del sangue che normalmente viene osservato dopo l'introduzione per via intragastrica di amido nei topi nutriti secondo una dieta HFD. In qualsiasi momento dell'analisi la glicemia presente nel sangue era notevolmente inferiore nei topi trattati con l'estratto di

alghe, rispetto agli esemplari di controllo. Pertanto, il valore AUC_{0-180} medio nei topi a cui è stato somministrato l'estratto di alghe è risultato essere inferiore rispetto a quello degli esemplari di controllo (rispettivamente, 20.906 vs. 26.689 $mg \cdot min/dL$).

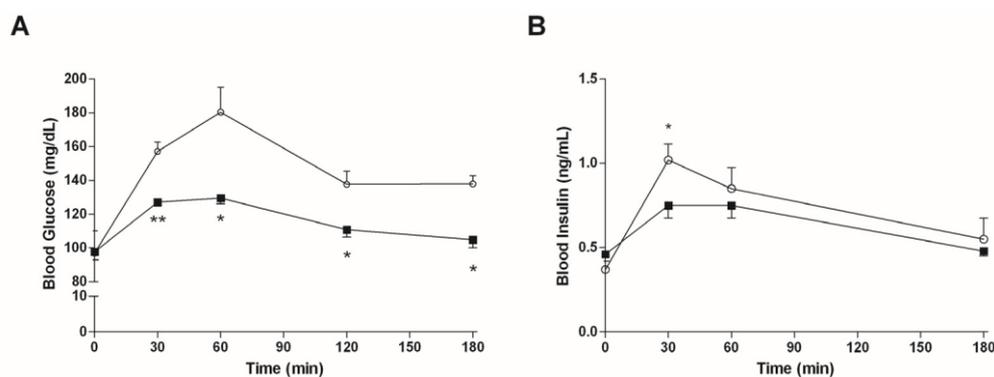


Immagine 5. Livelli di glicemia postprandiale nel plasma (A) e d'insulina (B) nei topi sottoposti ad una dieta ad alto contenuto di grassi e trattati con eccipiente (○, $n = 15$) o con 7,5 mg/kg bw di estratto algale (■, $n = 15$). I dati sono presentati come medie \pm SD, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. topi trattati con eccipiente, test t di Student per dati indipendenti.

Come da Immagine 5B, nei topi NASH, il picco insulinico è stato raggiunto 30 min dopo la sonda gastrica ed è diminuito considerevolmente con la somministrazione dell'estratto di alghe. I valori AUC confermano una riduzione della secrezione d'insulina (rispettivamente 114 vs. 132 $ng \cdot min/mL$ nei topi trattati con estratto di alghe e negli esemplari di controllo).

4. Discussione

Gli studi preclinici e clinici hanno già dimostrato che gli estratti di alghe possono ridurre la produzione di glucosio dal maltosio e/o saccarosio inibendo l' α -glucosidasi [32,35], un enzima situato nella membrana con orletto a spazzola dell'intestino tenue. Gli inibitori dell' α -glucosidasi come l'acarbosio ed il voglibosio [36,37] sono ampiamente utilizzati nella cura del T2D.

Nel presente studio abbiamo studiato l'effetto inibitorio in vitro di un fitocomplesso estratto dal *Fucus vesiculosus* e dall'*Ascophyllum nodosum* sull' α -glucosidasi e sull' α -amilasi, due enzimi intestinali coinvolti nella digestione dei carboidrati. Roy et al. avevano già dimostrato la capacità inibitoria di un fitocomplesso ottenuto dalle suddette alghe su entrambi gli enzimi [32] e questa ricerca ne è stata un'ulteriore conferma. In particolare, il valore IC_{50} di questo estratto per l'inibizione dell' α -amilasi era dalle 10 alle 1000 volte inferiore rispetto al valore riportato per gli estratti di alghe preparati con i solventi [17], gli estratti di frutta [38] o i polifenoli ottenuti da altre piante [39,40]. I valori K_i ($6,0 \times 10^{-8}$ M) indicavano anche una forte affinità nel legame del componente inibitorio delle alghe con l' α -amilasi. La presente ricerca ha confermato tali osservazioni comprovando che le potenze inibitorie delle misture algali sui due enzimi digestivi sono maggiori rispetto a quelle dell'acarbosio, un'inibitore prototipo dell' α -glucosidasi. È già stato segnalato come l'effetto inibitorio sia dovuto all'alto contenuto dei diversi composti bioattivi presenti nell'estratto di alghe, in particolare i florotannini (PHT) [41,42] e gli acidi grassi [43]. Per constatare la presenza di tali componenti algali abbiamo svolto un'analisi del fingerprint dell'estratto, grazie alla quale abbiamo potuto confermare la presenza di tre tipi principali di componenti: polisaccaridi, polifenoli e grassi acidi.

Per verificare la capacità di questo fitocomplesso di ridurre i livelli di glicemia post-prandiale nel plasma, dovuta all'inibizione dei due enzimi intestinali, abbiamo effettuato uno studio in vivo utilizzando topi sottoposti ad una dieta regolare o ad una dieta ad alto contenuto di grassi. La somministrazione di HFD ha provocato l'accumulo di grasso nel fegato dei ratti, che, unitamente alla deposizione del tessuto fibrotico, rappresenta una prima manifestazione della NASH [23]. Nei due gruppi murini sono state rilevate diverse modulazioni dei livelli glicemici post-prandiali, dato che l'estratto di alghe ha solo ritardato la comparsa del picco glicemico nel sangue dei topi sottoposti ad una dieta regolare (rispettivamente 30 min vs. 60 min dopo il pasto negli esemplari di controllo e nei topi trattati con le alghe), senza modificare l'area sottostante la curva glicemica. Le curve glicemiche dei topi trattati con l'estratto di alghe hanno presentato caratteristiche che sono solitamente associate a cibi con un basso indice glicemico (IG), ovvero un lento assorbimento del glucosio, dal momento che il livello di glicemia

dei topi trattati era significativamente più elevato dopo 180 min rispetto a quello riscontrato negli esemplari di controllo ($p < 0,05$). Tali risultati suggeriscono come i fitocomplessi algali possano essere utilizzati come integratori alimentari che, se presi prima di un pasto, sono in grado di rallentare la digestione e l'assimilazione dei carboidrati, trasformando così la risposta glicemica dei cibi con elevato IG in una risposta tipica di alimenti a basso IG. Nei topi HFD abbiamo dimostrato che questo fitocomplesso può incidere sul picco glicemico post-prandiale che non è stato rallentato ma considerevolmente ridotto ($p < 0,05$) e sul livello generale di glicemia nel sangue, che è risultato inferiore in tutti i momenti in cui è stato misurato, comportando un AUC significativamente ridotto ($p < 0,05$). Pertanto, la somministrazione di tale fitocomplesso in una dieta particolarmente ricca di grassi è associata ad una digestione lenta dei carboidrati, ma anche ad una minore assimilazione di questi ultimi. Dal momento che i picchi insulinici sono diminuiti notevolmente (Immagini 4B e 5B) sia nei topi sani sia nei topi NASH dopo la somministrazione della miscela algale, possiamo concludere che la riduzione dei livelli glicemici nel plasma non è dovuta ad un aumento della secrezione d'insulina, ma più probabilmente ad un rallentamento dell'assorbimento del glucosio. Attualmente il nostro laboratorio sta effettuando ricerche sull'effetto della somministrazione cronica del suddetto estratto di alghe e su ulteriori dati relativi al/i meccanismo/i con cui esso condiziona i livelli di glicemia post-prandiale nel plasma e d'insulina ed i danni sul fegato nei topi NASH.

I risultati ottenuti dagli animali comprovano anche l'effetto benefico dell'estratto ricavato da *A. nodosum* e *F. vesiculosus* nella modulazione della glicemia post-prandiale dopo i pasti. Tale effetto non può essere giustificato unicamente dalla presenza di fibre alimentari nell'estratto poiché è risaputo che queste ultime riducono solamente la risposta glicemica post-prandiale se somministrate in dosi elevate (da 2,5 a 7,5 g negli esseri umani)[44,45]. L'attuale somministrazione prevedeva per gli animali un quantitativo di fibre alimentari pari a circa 6 mg/kg·bw, equivalenti a 420 mg in una persona di 70 kg. Inoltre, studi precedenti che hanno analizzato l'effetto delle fibre alimentari nei topi hanno dimostrato che i livelli glicemici si erano considerevolmente abbassati in seguito all'introduzione di almeno il 10% di fibre nella dieta [46]. Tali osservazioni indicano che l'attività inibitoria osservata è più probabilmente legata al fitocomplesso ottenuto dall'*A. nodosum* e dal *F. vesiculosus* e non al suo contenuto di fibre, dato che la quantità di fibre somministrate nel presente studio era inferiore al 10% degli alimenti assunti. Oltre ai florotannini che, come già sottolineato nell'Introduzione, sono noti inibitori degli enzimi digestivi, abbiamo individuato la presenza di acidi grassi nell'estratto algale grazie all'¹H-NMR ed alla GC-MS. Come hanno dimostrato recentemente Bingrui ed i suoi collaboratori[43], gli acidi grassi di un estratto algale possono inibire l' α -glucosidasi. Pertanto, la presenza di florotannini e di acidi grassi, entrambi inibitori degli enzimi con caratteristiche chimiche e farmacologiche differenti, aumenta la loro potenza farmacologica, come dimostrato dal fatto che i valori IC50 degli estratti di alghe da noi calcolati sono inferiori a quelli precedentemente riportati nella letteratura relativa ai singoli componenti ed all'acarbiosio [43].

In conclusione, i risultati di questo studio indicano che il presente estratto di alghe può essere utile nel controllo della digestione e dell'assorbimento dei carboidrati. Tale effetto è visibile soprattutto in un modello murino di NASH ottenuto con la somministrazione di una dieta ad alto contenuto di grassi. Dal momento che la NAFLD e la NASH possono precedere la comparsa di T2DM, l'utilizzo di questo estratto naturale può essere sfruttato terapeuticamente per prevenire o ritardare la suddetta transizione.

Materiali Integrativi: Quanto segue è disponibile online sul sito www.mdpi.com/1660-3397/15/2/41/s1, Immagine S1: spettro ¹H-NMR dell'estratto algale in metanolo deuterato, Immagine S2: spettro ¹H-NMR dell'estratto algale in acqua deuterata Immagine S3: HPLC a permeazione di gel, Immagine S4: cromatogramma GC-MS per l'identificazione di acidi grassi metilati.

Ringraziamenti: Ringraziamo Pietro Palatini per le preziose argomentazioni e Mauro Berto per la sua esperta assistenza tecnica. Il presente lavoro è stato sostenuto per mezzo di una borsa di studio dall'Università di Padova (CPDA138721/13) e da Aesculapius Farmaceutici S.r.l.

Contributi degli autori: Sara De Martin ha ideato e progettato gli esperimenti; Daniela Gabbia, Stefano Dell'Acqua, Iole Maria Di Gangi, Valentina Caputi, Ilaria Marsilio e Nicola Paccagnella hanno svolto gli esperimenti; Laura Albertoni ha effettuato le analisi istologiche; Daniela Gabbia, Stefano Dall'Acqua, Sara Bogianni, Maria Carrara, Maria Cecilia Giron e Sara De Martin hanno analizzato i dati; Daniela Gabbia e Sara De Martin hanno redatto l'articolo scientifico; Maria Cecilia Giron ha revisionato il documento.

Conflitti d'Interessi: Gli autori non dichiarano alcun conflitto d'interessi. Gli autori hanno svolto gli esperimenti e le analisi statistiche autonomamente e hanno permesso al personale di Aesculapius l'accesso ai dati ed ai risultati solo una volta terminato lo studio. Gli sponsor iniziali non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta, nell'analisi o nell'interpretazione dei dati, nella stesura del documento e nella decisione di pubblicare i risultati.

Bibliografia

1. Ruperez, P.; Ahrazem, O.; Leal, J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 840–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rindi, F.; Soler-Vila, A.; Guiry, M.D. Taxonomy of Marine Macroalgae Used as Sources of Bioactive Compounds. In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*; Hayes, M., Ed.; Springer: Boston, MA, USA, 2012; pp. 1–53.
3. Apostolidis, E.; Lee, C.M. In vitro potential of *Ascophyllum nodosum* phenolic antioxidant-mediated alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibition. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, H97–H102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kandra, L.; Gyemant, G.; Zajacz, A.; Batta, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 1265–1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Nwosu, F.; Morris, J.; Lund, V.A.; Stewart, D.; Ross, H.A.; McDougall, G.J. Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1006–1012. [[CrossRef](#)]
6. Gupta, S.; Abu-Ghannam, N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 315–326. [[CrossRef](#)]
7. Holdt, S.L.; Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 543–597. [[CrossRef](#)]
8. Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules* **2008**, *13*, 1671–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lahaye, M. Marine algae as sources of fibres: Determination of soluble and insoluble dietary fibre contents in some? Sea vegetables? *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *54*, 587–594. [[CrossRef](#)]
10. Mabeau, S.; Fleurence, J. Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, *4*, 103–107. [[CrossRef](#)]
11. Landin, K.; Holm, G.; Tengborn, L.; Smith, U. Guar gum improves insulin sensitivity, blood lipids, blood pressure, and fibrinolysis in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **1992**, *56*, 1061–1065. [[PubMed](#)]
12. Ou, S.; Kwok, K.; Li, Y.; Fu, L. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1026–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Atashrazm, F.; Lowenthal, R.M.; Woods, G.M.; Holloway, A.F.; Dickinson, J.L. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2327–2346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mak, W.; Wang, S.K.; Liu, T.; Hamid, N.; Li, Y.; Lu, J.; White, W.L. Anti-Proliferation Potential and Content of Fucoidan Extracted from Sporophyll of New Zealand *Undaria pinnatifida*. *Front. Nutr.* **2014**, *1*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kurihara, H.; Mitani, T.; Kawabata, J.; Takahashi, K. Two new bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 882–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Liu, M.; Hansen, P.E.; Lin, X. Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1273–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zhang, J.; Tiller, C.; Shen, J.; Wang, C.; Girouard, G.S.; Dennis, D.; Barrow, C.J.; Miao, M.; Ewart, H.S. Antidiabetic properties of polysaccharide- and polyphenolic-enriched fractions from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *85*, 1116–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Sales, P.M.; Souza, P.M.; Simeoni, L.A.; Silveira, D. alpha-Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *15*, 141–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Etxeberria, U.; de la Garza, A.L.; Campion, J.; Martinez, J.A.; Milagro, F.I. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opin. Ther. Targets* **2012**, *16*, 269–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kim, K.Y.; Nguyen, T.H.; Kurihara, H.; Kim, S.M. Alpha-glucosidase inhibitory activity of bromophenol purified from the red alga *Polyopes lancifolia*. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, H145–H150. [[PubMed](#)]
21. Rabasa-Lhoret, R.; Chiasson, J. Alpha-Glucosidase Inhibitors. In *International Textbook of Diabetes Mellitus*; John Wiley & Sons, Ltd.: London, UK, 2004.

22. Porte, D. Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Metab. Res.* **2001**, *17*, 181–188. [[CrossRef](#)]
23. Miele, L.; Targher, G. Understanding the association between developing a fatty liver and subsequent cardio-metabolic complications. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *9*, 1243–1245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Anstee, Q.M.; Targher, G.; Day, C.P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 330–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nadalin, S.; Malago, M.; Valentin-Gamazo, C.; Testa, G.; Baba, H.A.; Liu, C.; Fruhauf, N.R.; Schaffer, R.; Gerken, G.; Frilling, A.; et al. Preoperative donor liver biopsy for adult living donor liver transplantation: Risks and benefits. *Liver Transplant.* **2005**, *11*, 980–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cobbold, J.F.; Anstee, Q.M.; Goldin, R.D.; Williams, H.R.; Matthews, H.C.; North, B.V.; Absalom, N.; Thomas, H.C.; Thursz, M.R.; Cox, R.D.; et al. Phenotyping murine models of non-alcoholic fatty liver disease through metabolic profiling of intact liver tissue. *Clin. Sci.* **2009**, *116*, 403–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Musso, G.; Gambino, R.; Cassader, M.; Pagano, G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann. Med.* **2011**, *43*, 617–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Silverman, J.F.; Pories, W.J.; Caro, J.F. Liver pathology in diabetes mellitus and morbid obesity. Clinical, pathological, and biochemical considerations. *Pathol. Annu.* **1989**, *24 Pt 1*, 275–302. [[PubMed](#)]
29. Smith, B.W.; Adams, L.A. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 456–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Vonghia, L.; Ruysers, N.; Schrijvers, D.; Pelckmans, P.; Michiels, P.; De Clerck, L.; Ramon, A.; Jirillo, E.; Ebo, D.; De Winter, B.; et al. CD4+ROR gamma t++ and Tregs in a Mouse Model of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 239623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Nakamura, A.; Terauchi, Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21240–21257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Roy, M.; Anguenot, R.; Fillion, C.; Beaulieu, M.; Bérubé, J.; Richard, D. Effect of a commercially-available algal phlorotannins extract on digestive enzymes and carbohydrate absorption in vivo. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 3026–3029. [[CrossRef](#)]
33. Ghosh, S.; Ahire, M.; Patil, S.; Jabgunde, A.; Bhat Dusane, M.; Joshi, B.N.; Pardesi, K.; Jachak, S.; Dhavale, D.D.; Chopade, B.A. Antidiabetic Activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2012**, *2012*, 929051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jegou, C.; Kervarec, N.; Cerantola, S.; Bihannic, I.; Stiger-Pouvreau, V. NMR use to quantify phlorotannins: The case of *Cystoseira tamariscifolia*, a phloroglucinol-producing brown macroalga in Brittany (France). *Talanta* **2015**, *135*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Paradis, M.E.; Couture, P.; Lamarche, B. A randomised crossover placebo-controlled trial investigating the effect of brown seaweed (*Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*) on postchallenge plasma glucose and insulin levels in men and women. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2011**, *36*, 913–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Shimada, H.; Matsuda, H.; Yamahara, J.; Tanabe, G.; Muraoka, O. Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the Ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8367–8370. [[CrossRef](#)]
37. Yoshikawa, M.; Morikawa, T.; Matsuda, H.; Tanabe, G.; Muraoka, O. Absolute stereostructure of potent alpha-glucosidase inhibitor, Salacinol, with unique thiosugar sulfonium sulfate inner salt structure from *Salacia reticulata*. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1547–1554. [[CrossRef](#)]
38. McDougall, G.J.; Shpiro, F.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit alpha-Amylase and alpha-Glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2760–2766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Koh, L.W.; Wong, L.L.; Loo, Y.Y.; Kasapis, S.; Huang, D. Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 148–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Lo Piparo, E.; Scheib, H.; Frei, N.; Williamson, G.; Grigorov, M.; Chou, C.J. Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3555–3561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. O'Sullivan, L.; Murphy, B.; McLoughlin, P.; Duggan, P.; Lawlor, P.G.; Hughes, H.; Gardiner, G.E. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2038–2064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Kim, K.; Rioux, L.; Turgeon, S.L. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* **2014**, *98*, 27–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, B.; Kongstad, K.T.; Wiese, S.; Jager, A.K.; Staerk, D. Edible seaweed as future functional food: Identification of alpha-glucosidase inhibitors by combined use of high-resolution alpha-glucosidase inhibition profiling and HPLC-HRMS-SPE-NMR. *Food Chem.* **2016**, *203*, 16–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jenkins, A.L.; Kacinik, V.; Lyon, M.R.; Wolever, T.M. Reduction of postprandial glycemia by the novel viscous polysaccharide PGX, in a dose-dependent manner, independent of food form. *J. Am. Coll. Nutr.* **2010**, *29*, 92–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jenkins, A.L.; Kacinik, V.; Lyon, M.; Wolever, T.M. Effect of adding the novel fiber, PGX[®], to commonly consumed foods on glycemic response, glycemic index and GRIP: A simple and effective strategy for reducing post prandial blood glucose levels—A randomized, controlled trial. *Nutr. J.* **2010**, *9*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, Z.Q.; Zuberi, A.R.; Zhang, X.H.; Macgowan, J.; Qin, J.; Ye, X.; Son, L.; Wu, Q.; Lian, K.; Cefalu, W.T. Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism, and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet. *Metabolism* **2007**, *56*, 1635–1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).