

Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto de *Laurencia obtusa* frente a herpesvirus y virus dengue

Preliminary evaluation of the antiviral activity of *Laurencia obtusa* extract against herpesvirus and dengue virus

Laritza Rojas Pérez,^I Mayling Álvarez Vera,^{II} Luis Francisco Morier Díaz,^{III} Olga Valdés Iglesias,^{IV} Gloria del Barrio Alonso^I

^I Grupo de Antivirales Naturales. Dpto. de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.

^{II} Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus. Departamento de Virología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

^{III} Laboratorio de Cultivo de Células. Departamento de Asistencia Científico-Técnica. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

^{IV} Departamento de Química. Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: los virus del herpes simplex y el virus dengue se encuentran entre los patógenos humanos de mayor importancia dados los altos niveles de morbilidad y mortalidad que provocan. El fallo en el desarrollo de vacunas para ambos virus, así como la ausencia de fármacos para el tratamiento del dengue y el surgimiento de nuevas variantes virales resistentes a las drogas existentes para los herpesvirus, incrementa la necesidad de buscar nuevas fuentes de compuestos con actividad antiviral. En este sentido las algas son una alternativa interesante debido a la diversidad de compuestos con actividad biológica que se han aislado de estos organismos.

Objetivo: evaluar la actividad antiviral *in vitro* de un extracto hidroalcohólico del alga roja *Laurencia obtusa* frente a virus herpes simplex tipo1, herpes simplex tipo 2 y virus dengue

Métodos: se determinó el valor de concentración citotóxica media empleando el ensayo de reducción de MTT en células Vero y C6/36HT. El cálculo de la concentración efectiva media se realizó mediante inhibición del efecto citopático en

células Vero o C6/36HT, dependiendo del virus. El índice selectivo se calculó a partir de la relación $IS=CC_{50}/CE_{50}$.

Resultados: el extracto hidroalcohólico de *L. obtusa* no es tóxico en las células Vero y C6/36HT, en el rango de concentraciones evaluadas. El extracto inhibió la replicación *in vitro* de los virus HHV 1 y HHV 2 en células Vero con valores de $IS > 29$ y 42 , respectivamente. Por otra parte no se observó inhibición de la replicación de DENV-2 en células C6/36HT.

Conclusiones: el extracto hidroalcohólico de *L. obtusa* posee actividad antiviral frente a HHV 1 y HHV 2 pudiera ser empleado en el desarrollo de fármacos antiherpéticos novedosos. Este trabajo constituye el primer informe sobre la actividad antiviral de esta especie de alga.

Palabras claves : *Laurencia obtusa*; antiviral; herpes; dengue.

ABSTRACT

Introduction: herpes simplex and dengue viruses are the most important human pathogens with high levels of morbidity and mortality. Lack of vaccine development for these viruses, non-existence of drugs for dengue treatment and the emergence of new herpes virus variants resistant to drugs currently in use reinforce the need for new sources of antiviral drugs. Algae remain an interesting alternative in this regard, due to the diversity of compounds with biological activity found in these organisms.

Objective: to evaluate the *in vitro* antiviral activity of a hydroalcoholic extract of the red seaweed *Laurencia obtusa* against herpes simplex type 1, herpes simplex type 2 and dengue virus.

Methods : the mean cytotoxic concentration was determined by using the MTT reduction assay in Vero and C6/36HT cells. Mean effective concentration was estimated with the cytopathic effect inhibition in Vero or C6/36HT cells depending on the virus. Selective index (SI) = CC_{50}/EC_{50} was calculated.

Results: hydroalcoholic extract from *L. obtusa* was not toxic at the evaluated concentrations. The extract managed to inhibit HHV 1 y HHV 2 virus replication in Vero cells with SI values higher than 29 and 42, respectively. On the other hand there was no inhibition of DENV-2 replication in C6/36HT cells.

Conclusions : hydroalcoholic extract from *L. obtusa* showed *in vitro* antiviral activity against HHV 1 and HHV 2 and could be employed as a source for new antiviral compounds. This is the first report on the antiviral activity of this alga species.

Keywords: *Laurencia obtusa* ; antiviral; herpes; dengue.

INTRODUCCIÓN

Los virus del herpes simplex y el virus dengue se encuentran entre los patógenos humanos con altos niveles de mortalidad y morbilidad.¹ El fallo en el desarrollo de vacunas,² la ausencia de antivirales para el tratamiento de la infección por virus dengue³ y la aparición de nuevas variantes virales de herpes virus resistentes a las

drogas que se encuentran en uso actualmente⁴ incrementa la necesidad de buscar nuevos antivirales. Las algas constituyen una alternativa para la obtención de nuevas drogas antivirales, considerando la diversidad de metabolitos secundarios con estructuras novedosas descritos en estos organismos. Las condiciones ambientales en las que se desarrollan, las convierten en una fuente muy atractiva para la búsqueda de moléculas de interés farmacológico.⁵ En los miembros del *Phyllum Rhodophyta* (macroalgas rojas) se han descritos una gran variedad de compuestos con actividad antiinflamatoria, neuroprotectora, antihelminfos, antioxidante, antitumoral y antibacteriana.⁶ Adicionalmente los miembros de este *Phyllum* exhiben actividad antiviral frente a varios virus patógenos de humanos. Metabolitos aislados de varias especies de algas rojas mostraron actividad frente a HHV1 y HHV2⁷, VIH⁸ y DENV-2, DENV-3 y DENV-4.⁹

En este trabajo se evaluó la actividad antiviral *in vitro* de un extracto hidroalcohólico del alga roja *Laurencia obtusa* frente a HHV 1 y HHV 2 y DENV-2.

MÉTODOS

MATERIAL A EVALUAR

El muestreo de *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux, 1813 (*Rhodophyta*, *Rhodomelaceae*) se realizó en la zona de arrecife adyacente al Rincón de Guanabo, al noreste de La Habana (23°10'48"N y 82°06'02"E) en el mes de mayo del año 2008.

La colecta se realizó mediante buceo en SCUBA. Posteriormente se procedió a la identificación taxonómica de la especie, autenticada por el Dr. A.J. Areces según Littler y Littler;¹⁰ y colocada en el herbario del Acuario Nacional de Cuba (IdO 232). Todas las muestras fueron lavadas con agua de mar, separadas manualmente de epifitas y materias extrañas y conservadas en congelación a -20 °C.

Para la preparación de los extractos, las algas fueron molinadas y homogeneizadas con una solución hidroetanólica (50 %) en una relación 1:10. El extracto fue mantenido a 10 °C, por 72h con agitación periódica y luego filtrado por lona, centrifugado a 10 000 *xg* y concentrado en un evaporador rotatorio a 50 °C hasta un nivel de sólido aproximado del 15 %. A continuación fueron secados por liofilización con N₂ líquido para su posterior análisis y evaluación de la actividad.

La caracterización fitoquímica preliminar del extracto se realizó según las técnicas descritas por Miranda y Cuéllar¹¹ mientras que el contenido de polifenoles totales fue ejecutado mediante la técnica colorimétrica referida en la Farmacopea Británica¹² (BP por sus siglas en inglés) para la determinación de taninos utilizando el pirogalol como patrón de referencia. Para el análisis de los componentes químicos mayoritarios en el extracto se utilizaron los métodos Proteínas solubles por método de Bradford,¹³ usando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como patrón de referencia (1 mg. ml⁻¹), azúcares solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico¹⁴ con D(+) galactosa como estándar, lípidos totales por extracción con solventes según Bligh y Dyer¹⁵ y su cuantificación colorimétrica por reacción con dicromato de potasio en medio ácido según Craigie y Leigh,¹⁶ con el uso de una solución de colesterol como patrón.

VIRUS Y LÍNEAS CELULARES

Para la evaluación de la actividad antiviral se emplearon los virus HHV 1 y HHV 2 procedentes de aislamientos clínicos, gentilmente donados por la Dr. María Oña (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, España) y propagados en la línea celular de riñón de mono verde africano (Vero) (ECACC No. 84113001). Las células Vero se cultivaron en medio Mínimo *Eagle* Modificado (DMEM) (*Gibco BRL*) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SFB) (*SIGMA*). En los ensayos antivirales, las células se mantuvieron en medio DMEM pero sin suero.

Para la evaluación de la actividad antiviral frente al virus dengue se utilizó la cepa A15 (2PR 4P C6/36HT), de virus dengue 2 (DENV-2) obtenida a partir del banco de muestras clínicas del Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK). El virus fue propagado en la línea celular de mosquito C6/36HT (sublínea obtenida a partir de C6/36 que crece a 34 °C) donada por el CDC de San Juan de Puerto Rico al Laboratorio de Cultivos Celulares del IPK. Esta línea crece a 33 °C en medio MEM suplementado con 1 % de L-glutamina y 10 % de SFB (*SIGMA*).

Los virus empleados se titularon mediante un ensayo de punto final 50 %¹⁷ en el que el resultado se expresa como dosis infectiva media en cultivo celular por mililitro (TCID₅₀.mL⁻¹).

ENSAYO DE TOXICIDAD

La determinación de citotoxicidad se realizó mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT).¹⁸ Se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano con monocapa confluyente de células Vero o C6/36HT, sembradas 48 horas antes. El rango de concentraciones evaluadas fue de 1-5 000 µg.mL⁻¹ (siete réplicas por concentración) y las placas se incubaron a 37 °C/33 °C, en atmósfera con 5 % de CO₂. Se realizó observación diaria al microscopio invertido con el objetivo de apreciar cambios morfológicos que indicaran toxicidad. Al cabo de las 72 horas se añadió a cada pocillo 10 µL de MTT 5 000 µg.mL⁻¹ disuelto en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) (0,01mol.L⁻¹; pH 7). Se agitó levemente y se incubó durante 4 horas a la temperatura de crecimiento de cada línea celular, protegido de la exposición a la luz. Posteriormente se eliminó cuidadosamente todo el contenido de la placa y se disolvieron los cristales de formazán con 100 µL de DMSO por pocillo. La absorbancia se midió a 540 nm con longitud de onda de referencia a 620 nm en un espectrofotómetro lector de placas multipozos (*MRX Revelation, Dynex Technologies®*) con el programa integrado *DynexRevelation 4.02*.

El porcentaje de viabilidad celular asociado a cada concentración del extracto se calculó dividiendo el valor medio de la absorbancia de los cultivos tratados con dicha concentración entre el valor medio de absorbancia de los controles de células (sin tratar), los cuales se consideraron el 100 % de viabilidad celular. Se determinó el valor de la CC₅₀ mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta, obtenida al graficar (concentración del extracto-porcentaje de viabilidad celular).

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL

La evaluación primaria de la actividad antiviral del extracto se realizó mediante la lectura de ECP.¹⁹ En este ensayo se emplearon placas de 96 pocillos con monocapa celular confluyente. Para ello se retiró el medio de crecimiento de la placa y se añadieron

90 µL del extracto cubriendo un rango de concentraciones 0-5 000 µg.mL⁻¹ (no citotóxicas) exceptuando la columna que correspondió al control de virus. Se incubó la placa durante una hora a la temperatura de crecimiento de cada línea celular en atmósfera con 5 % de CO₂. Pasado este tiempo se adicionaron 10 µL de virus con 100 TCID₅₀.mL⁻¹ a cada pocillo, exceptuando la columna que correspondió al control de células. Las placas se incubaron a la temperatura de crecimiento, en atmósfera con 5 % de CO₂ y se observaron diariamente durante 72 horas. Se determinó para cada concentración del extracto el porcentaje de pocillos con ECP. Se obtuvo el valor de concentración que inhibe la multiplicación viral en el 50 % de los pocillos (CE₅₀) mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta (concentración de extracto-porcentaje de pocillos con ECP).

PROCESAMIENTO DE LOS RESULTADOS

La concentración citotóxica media (CC₅₀) y la concentración efectiva media (CE₅₀), se calcularon mediante análisis de regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia usando las curvas dosis-respuesta generadas a partir de los datos experimentales. Todos los resultados se presentan como valores medios y desviaciones estándar de dos experimentos. En cada caso se calculó el valor del índice selectivo, teniendo en cuenta la relación de la concentración citotóxica media y la concentración efectiva media ($IS=CC_{50}/CE_{50}$), se consideró $IS \geq 10$ como criterio de actividad antiviral.²⁰

RESULTADOS

En el cuadro se muestra la composición cualitativa del extracto en los metabolitos secundarios. Los resultados coinciden si se tiene en cuenta la presencia de terpenos en la fracción lipídica, de los polifenoles entre los que se encuentran los flavonoides. La respuesta a los reactivos de *Drangerdoff* y *Wagner* de forma moderada deberá tenerse en cuenta para los resultados del trabajo con *L. obtusa* por el valor de los alcaloides como compuestos bioactivos.

En la tabla 1 aparece la composición química mayoritaria del extracto, la fracción polisacáridica es predominante así como la fracción lipídica lo que no es común en especies de algas marinas. Se observa también el nivel de polifenoles totales en el extracto de *L. obtusa* que pueden contribuir también a su actividad antiviral.

Tabla 1. Caracterización química del extracto de *L. obtusa* (n=5)

Componentes	Rangos
Lípidos (%)	6,2-6,52
Proteína soluble (%)	4,49-6,99
Polisacáridos solubles (%)	30,78-37,30
Polifenoles (mg-g ⁻¹ Pirogalol±DS)	12,31±1,77

La exposición de las células Vero y C6/36HT al extracto durante 72 h no provocó cambios en su morfología en ninguno de los casos, asimismo la relación viabilidad celular-concentraciones del extracto tuvo un comportamiento lineal (figura 1 A y B), con coeficientes de regresión (R²) de 0,881 y 0,991 respectivamente.

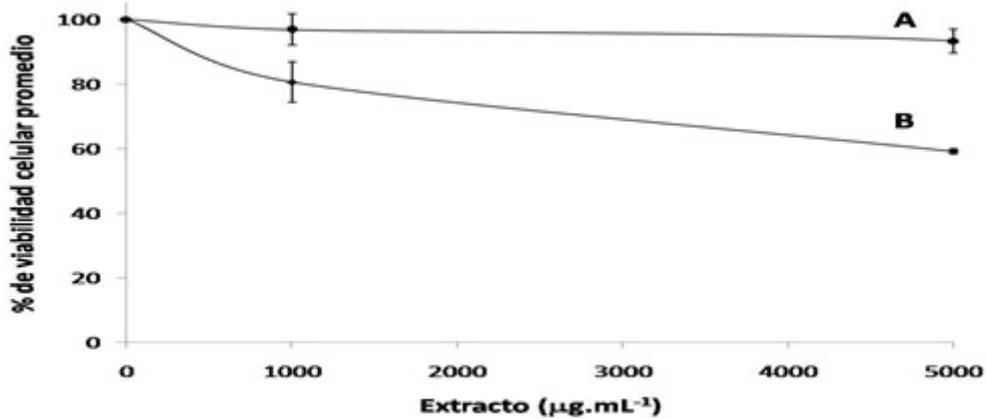


Fig. 1. Variación de la viabilidad de células Vero (A) y C6/36HT (B) frente a concentraciones crecientes (0-5000 µg.mL⁻¹) de *L. obtusa*, evaluadas mediante el ensayo de MTT. Cada punto representa la media de dos experimentos.

El extracto de *L. obtusa* no mostró toxicidad en ninguna de las dos líneas celulares a las concentraciones evaluadas (0-5 000 µg.mL⁻¹) y se obtuvieron porcentajes de viabilidad celular superiores al 50 %, por lo que se consideró la CC₅₀ como mayor que 5 000 µg.mL⁻¹ en los dos casos.

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL EXTRACTO DE *L. OBTUSA* FRENTE A HHV 1, HHV 2 Y DENV-2

Los resultados de los ensayos primarios de actividad antiviral muestran que el extracto *L. obtusa* posee actividad inhibitoria sobre la multiplicación *in vitro* de HHV 1 y HHV 2 en células Vero. En la figura 2 se muestran los resultados del ensayo frente a HHV 1 y HHV 2, observándose que se estableció una relación dosis-% de pocillos con ECP, evidenciada con coeficientes de regresión (R²) de 0,857 y 0,866 respectivamente.

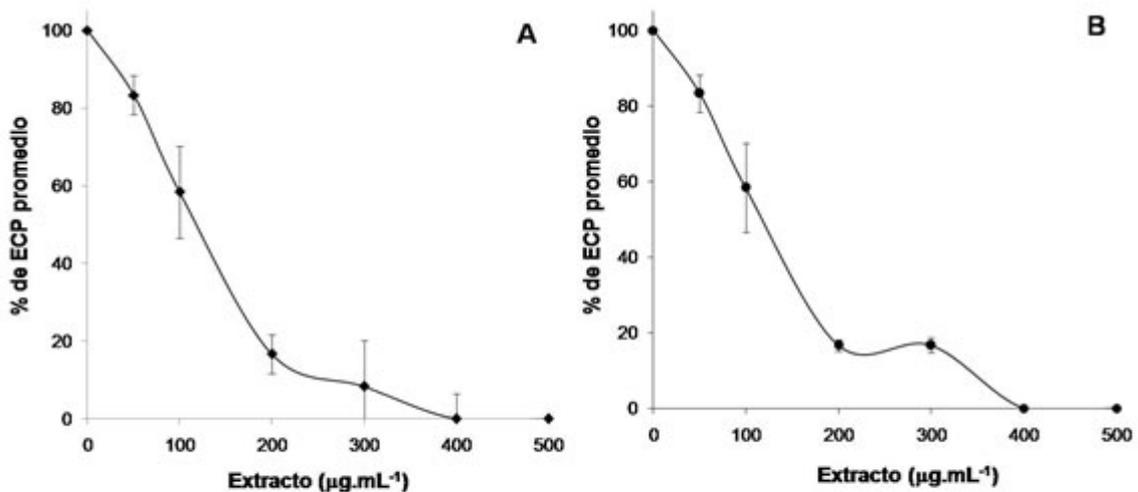


Fig. 2. Actividad inhibitoria del extracto de *Laurencia obtusa* sobre HHV 1 (A) y HHV 2 (B) teniendo en cuenta el porcentaje de pocillos con ECP para cada dosis evaluada. Cada punto representa la media de dos experimentos.

La determinación del valor de CE₅₀ empleando la ecuación de la recta mostró valores de 119±27,31 µg.mL⁻¹ para HHV 1 y de 141±2,44 µg.mL⁻¹ para HHV 2 obteniéndose índices selectivos mayores que 10 en ambos casos (tabla 2).

Tabla 2. Actividad antiviral del extracto acuoso de *L.obtusa* frente a virus HHV 1, HHV 2 y DENV-2.

Virus	CE ₅₀ (µg-mL ⁻¹)	IS
HHV 1	119±27,31	>42,1
HHV 2	141±2,44	>35,4
DENV-2	>5 000	NA

CE₅₀: Concentración que reduce el número de pocillos con efecto citopático en un 50 %
 IS: Índice selectivo
 NA: No actividad

El extracto de *L. obtusa* no mostró actividad inhibitoria de la multiplicación *in vitro* de virus dengue en células C6/36HT en el intervalo de concentraciones evaluadas, ya que a la mayor concentración de extracto ensayada se observó un 83% de pocillos con ECP.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico del alga roja *L. obtusa* frente a HHV 1 y HHV 2 y DENV-2 mediante la reducción del efecto citopático producido por estos virus en células Vero y C6/36HT respectivamente. El extracto no es tóxico para los sistemas celulares utilizados. Varios estudios informan resultados semejantes en la evaluación de citotoxicidad de extractos de algas en varias líneas celulares, con excepción de especies que fueron empleadas en ensayos de actividad frente a líneas tumorales.⁵ Se observó actividad antiviral del extracto de *L. obtusa* en cultivo de células (IS≥10)²⁰ frente a HHV 1 y HHV 2 mientras que no se observó actividad antiviral frente a virus dengue. Este trabajo constituye el primer informe de actividad antiherpética de *L. obtusa* aunque se informa esta actividad en otros miembros del *Phyllum Rhodophyta* como, *Grateloupia indica*,²¹ *Scinaia hatei*,²² *Sphaerococcus coronopifolius* y *Boergesenella thuyoides*.²³ En el caso de la actividad antiviral frente a virus DENV-2 igualmente existen varios informes en algas rojas como *Schizymeniabinderi*,²⁴ *Palisada perforate*,²⁵ *Callophyllisvariegata*,²⁶ y *Cryptonemia crenulata*,²⁷ en los que generalmente se asocia la actividad antiviral con la presencia de polisacáridos sulfatados y con la inhibición de la adsorción.

El contenido de polisacáridos solubles totales en *L. obtusa* es alto, además se conoce que en las algas rojas prevalece la producción de polisacáridos sulfatados como agar y carragenanos que pueden representar hasta el 70 % de su peso seco.²⁷

En este sentido es posible que la ausencia de actividad antidengue esté relacionada a las características de los receptores celulares que median el proceso infeccioso en

las células C6/36HT. Así hay informes que avalan una susceptibilidad diferencial de las células Vero y las C6/36 HT.^{9,27}

Cabe destacar que dentro de las algas rojas los miembros del género *Laurenciase* caracterizan por la producción de compuestos halogenados para los que se describe un amplio rango de actividades biológicas,²⁸ y por la presencia de elevados niveles de sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos.²⁹ Específicamente en *L. obtusa* se informa la presencia de C15 acetogeninas con actividad biológica,³⁰ de sesquiterpenos con actividad antibacteriana y antifúngica,³¹ actividad antitumoral³² y recientemente se actividad antiviral frente a virus Influenza A y B.³³

Los principales mecanismos de actividad antiviral descritos en algas involucran fundamentalmente a moléculas que participan en la etapa de adsorción.³⁴ Sin embargo no debe excluirse la posibilidad de que la acción del extracto se produzca sobre otra etapa del ciclo replicativo viral, teniendo en cuenta que aunque ambos son virus envueltos no se observa actividad frente a virus dengue. Además existen grandes diferencias en el ciclo replicativo de los virus de las familias *Herpesviridae* y *Flaviviridae*, lo que hace que las dianas virales susceptibles a inhibición por los compuestos presentes en el extracto sean muy diversas. Estos resultados demuestran que *L. obtusa* presenta una actividad inhibitoria específica frente a HHV 1 y HHV 2 lo que motiva para otros estudios con el objetivo de investigar su mecanismo de acción y la naturaleza química de los principios activos involucrados en esta actividad. A la vez que precisan estudios antidengue en otras líneas celulares, específicamente de mamíferos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de los miembros del Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del IPK, a la Téc. Emidalis Pérez por todo su apoyo en los ensayos de evaluación de actividad antiviral y especialmente a la Téc. Dianeya Mendoza Llanes del Laboratorio de Cultivo de Células del Departamento de Asistencia Científico-Técnica de esta institución por su valiosa colaboración en el trabajo con los cultivos de células C6/36HT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estadísticas sanitarias mundiales 2014. Ginebra: OMS; 2014.
2. Dasgupta G, Chentoufi A, Nesburn A, Wechsler S, BenMohamed L. New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8:1023-1035
3. Perry S, Buck M, Shresta S. Better late than never: antivirals for dengue. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2011;9:755-757.
4. Piret J, Boivin G. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Nucleoside Analogues: Mechanisms, Prevalence, and Management. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:459-472.

5. Wang L, Wang X, Wu H, Liu R. Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years. *Mar. Drugs*.2014;12:4984-5020.
- 6.Jassbia A, Mohabatia M, Eslamia S, SohrabipourBJ, Miri R. Biological Activity and Chemical Constituents of Red and Brown Algae from the Persian Gulf. *Iran J Pharm Res*. 2013;12:339-348.
7. Soares A, Robaina M, Mendes G, Silva T, Gestinari L, Pamplona O, Yoneshigue-Valentin Y, Kaiser C, Villela M. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Braz J Pharmacog*. 2012;22:714-723.
- 8.Barton C,Kouokam JC,Lasnik A, Foreman O, Cambon A, Brock G, et al. Activity and Effect of Subcutaneous Treatment with the Broad-Spectrum Antiviral Lectin Griffithsin in Two Laboratory Rodent Models. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014;58:120-127.
- 9.Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RGM, Faría PCS, Nosedá MD, Duarte MER, Damonte EB. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research*. 2005;66:103-110.
10. Littler DS, Littler MM. *Caribbean Reef Plants*. Washington: Off Shore Graphics;.2000.
11. Miranda M, Cuéllar A. *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Editorial Félix Varela; 2001.
12. *British Pharmacopoeia*. Vol IV (Appendix XI M). Tannins in Herbal Drugs. Londres: The Stationery Office; 2010. Disponible en: <http://www.pharmacopoeia.co.uk>
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem*.1976;72: 248-254.
14. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Chemistry*. 1956;28:350-356.
15. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochem.Physiol*. 1959;37(8):146-148.
- 16.Craigie JS, Leigh C. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge: Univ. Press; 1978. p. 109-131.
17. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg*. 1938;27:493-497.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.

19. del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract for *Phyllanthus orbicularis*. J Ethnopharmacology. 2000;72:317-322.
20. Wyde P, Ambrose M, Meyerson L, Gilbert B. The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolic polymer, against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats. Antiviral Research. 1993;20:145-154.
21. Chattopadhyay K, Mateu CG, Mandal P, Pujol CA, Damonte EB, Ray B.. Galactan sulfate of *Grateloupiaindica*: Isolation, structural features and antiviral activity. Phytochemistry. 2007; 68: 1428-1435.
22. Mandal P, Pujol CA, Carlucci MJ, Chattopadhyay K, Damonte EB, Ray B. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaiahatei*. Phytochemistry. 2008; 69: 2193-2199.
23. Bouhla IR, Haslin C, Chermann J, Collic-Jouault S, Siquin C, Simon G, et al. Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). Mar Drugs. 2011; 9(7): 1187-1209.
24. Matsuhiro B, Conte AF, Damonte EB, Kolender AA, Matulewicz MC, Mejías EG, et al. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymeniabinderi* (Gigartinales, Rhodophyta). Carbohydr Res. 2005; 340(15):2392-402.
25. Koishi AC, Zanello PR, Bianco ÉM, Bordignon J, Nunes Duarte dos Santos C. Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an *In Situ* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. PLoS ONE 2012; 7: e51089.
26. Rodríguez MC., Merino ER., Pujol CA., Damonte EB., Cerezo AS, Atulewicz MC. Galactans from cystocarpic plants of the red seaweed *Callophyllisvariegata* (Kallymeniaceae, Gigartinales). Carbohydr. Res. 2005; 340: 2742-2751.
27. Talarico LB, Nosedá MD, Ducatti DRB, Duarte MER, Damonte EB. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. Journal of General Virology. 2011; 92:1332-1342.
28. Cabrita MT, Vale C, Rauter AP. Halogenated Compounds from Marine Algae. Mar. Drugs. 2010; 8: 2301-2317.
29. Sun J, Shi D, Ma M, Li S, Wang S, Han L, et al. L-Sesquiterpenes from the red alga *Laurenciastristicha*. J. Nat. Prod. 2005; 68: 915-919.
30. Ayyad SE, Al-Footy KO, Alarif WM, Sobahi TR, Bassaif SA, Makki MS, et al. Bioactive C15 acetogenins from the red alga *Laurenciaobtusa*. Chem Pharm Bull. 2011; 59(10):1294-8.
31. König GM, Wright AD. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurenciaobtusa*. Planta Med. 1997; 63(2):186-7.

32. Alarif WM, Al-Lihaibi SS, Ayyad SE, Abdel-Rhman MH, Badria FA. Laurene-type sesquiterpenes from the Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor-antimicrobial agents. Eur J Med Chem. 2012; 55:462-6.

33. Pérez-Rivero A., Piñón Ramos A, Morier Díaz, Torres López Y, Mendoza Llanes D, Del Barrio Alonso G. Actividad antiviral de un extracto acuoso del alga roja *Laurencia obtusa* frente a virus influenza A y B. Rev Cubana Med Trop. 2014; 66. Disponible en:
<http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/40/29> .

34. Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. Curr Med Chem 2004; 11:2399-2419.

Recibido. 7 de septiembre de 2014
Aprobado: 8 de octubre de 2015

Gloria del Barrio Alonso . Grupo de Antivirales Naturales. Dpto. de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25, No.455, entre J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, Código Postal: 10 400 La Habana, Cuba. Teléfono: 7836 79 41. Correo electrónico: gbarrio@infomed.sld.cu