



\* B R 1 0 2 0 2 2 0 0 4 8 5 3 A 2 \*

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022004853-3 A2

(22) Data do Depósito: 16/03/2022

(43) Data da Publicação Nacional:  
26/09/2023

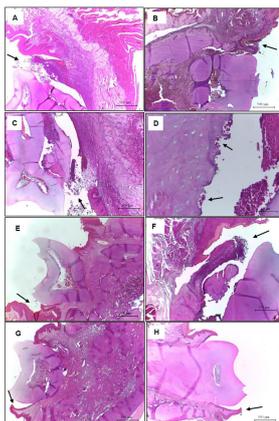
(54) **Título:** FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE CALOTROPIS PROCERA PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/24; A61K 135/00; A61P 1/02.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** JOSÉ VITOR MOREIRA LIMA FILHO; MÁRCIO VIANA RAMOS; RAFAEL FERRAZ NOVAES GOMES DA SILVA; SAULO CABRAL DOS SANTOS; LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO; LETHICIA SOUZA TAVARES.

(57) **Resumo:** FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE Calotropis procera PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL. A presente invenção trata de uma formulação fitoterapêutica denominada DP-LPp2, cujo setor técnico é a indústria farmacêutica, para tratamento de doença periodontal infecciosa bacteriana que contém como princípio ativo extratos protéicos ricos em proteases cisteínicas obtidos do látex da planta Calotropis procera. DP-LPp2 contém princípios ativos biodegradáveis e, portanto não recalcitrantes na natureza; pode ser obtido de forma mais rápida e mais barata que drogas alopáticas; não apresenta demonstrada toxicidade em culturas de células e/ou efeitos colaterais conhecidos em tratamentos endovenosos in vivo, em modelos animais, como observado com outras drogas comerciais; é eficiente em diminuir a expressão gênica de uma faixa ampla de mediadores inflamatórios associados a doença periodontal; é eficiente em diminuir a área e o número de infiltrados inflamatórios, além de diminuir a reabsorção óssea em modelo animal de doença periodontal; proteínas bioativas presentes possuem o potencial de serem clonadas em sistemas heterólogos.



FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera*  
PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL

### **Campo da invenção**

[001] A presente invenção trata de uma formulação fitoterapêutica, cujo setor técnico é a indústria farmacêutica, para tratamento de doença periodontal infecciosa bacteriana que contém como princípio ativo extratos protéicos ricos em proteases cisteínicas obtidos do látex da planta *Calotropis procera*.

### **Fundamentos da invenção**

[002] A doença periodontal ocorre quando o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar são destruídos pelo processo inflamatório desencadeado pelo acúmulo de biofilme bacteriano dental ou ainda por meio de uma variedade de aspectos clínicos, microbiológicos, patológicos, bioquímicos e imunológicos, sendo uma das principais ameaças à saúde bucal (Tonetti et al, 2018).

[003] As bactérias geralmente envolvidas no processo infeccioso incluem: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, and *Fusobacterium nucleatum* (Vieira et al., 2016). Se o infiltrado inflamatório derivado estiver distante do osso, a osteoclastogênese não é estimulada. No entanto, se o infiltrado é próximo ao osso, os osteoclastos são induzidos e ocorre reabsorção óssea. Dentre os principais mediadores envolvidos no processo inflamatório e em especial na atividade ósteo-reabsortiva, estão as citocinas do tipo interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a prostaglandina E2 (PGE2) (Lins, 2007).

[004] Não existe tratamento padronizado com eficácia comprovada para a doença periodontal (Camargo et al., 2016). Protocolos médicos experimentais podem incluir: a) administração prolongada de anti-inflamatórios não esteroides - o quais são associados a desconforto gastrointestinal, hemorragia, insuficiência renal e hepática e distúrbios do sistema nervoso central, entre outros (Preshaw, 2018); b) irrigação subgengival com antibióticos, por exemplo, cloridrato de tetraciclina, utilizado como terapia adjuvante durante a raspagem e alisamento radicular, que reduz a ação inflamatória da doença no tecido periodontal (Perayil et al., 2016),

mas podem produzir desequilíbrio da microbiota endógena e seleção de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (Olsen, 2015); c) tratamentos experimentais com: fluoxetina, que bloqueia a atividade de enzimas proteolíticas do hospedeiro, protegendo contra a reabsorção óssea periodontal e destruição das fibras de colágeno (Branco-de-Almeida et al., 2011); meloxicam, que aparentemente reduz a perda óssea alveolar por ação antiinflamatória na fase crônica da doença (Nassar et al., 2005); captopril, que modifica a expressão de mediadores inflamatórios no tecido periodontal, mas não foi capaz de reduzir a perda óssea na doença periodontal (Santos et al., 2015).

[005] *Calotropis procera* é uma planta da família Apocynaceae, sendo originária da África e Ásia e frequentemente encontrada em regiões áridas e tropicais por todo o mundo, desde a América Latina ao Oriente Médio (Mohamed et al., 2014; Parihar, 2016). No Brasil, é conhecida popularmente por algodão-de-seda, sendo espécie adaptada a regiões semiáridas e áridas, particularmente no Nordeste do Brasil. Desenvolve-se em solos degradados e locais com baixo índice pluviométrico, resistindo à seca, resistente ao estresse salino, permanecendo verde durante todo o ano, independente das intempéries.

[006] O látex da *C. procera* contém uma quantidade apreciável de proteínas com propriedades farmacológicas (Alencar et al., 2006; Ramos et al., 2009; Ramos et al., 2012). Este fluido é composto por uma parte de proteínas de alto peso molecular, que não são sujeitas a diálise (LP) e de uma fração de baixo peso molecular, rica em peptídeos e dialisável (DF) (Alencar et al., 2006). A separação cromatográfica e diálise da porção LP produz três frações protéicas distintas, denominadas de LPP1, LPP2 e LPP3 (Freitas et al., 2007).

[007] A fração protéica LPP2 é rica em proteases cisteínicas (Freitas et al., 2007). Estudos anteriores mostraram que LPP2 foi capaz de reduzir a adesão de leucócitos ao endotélio vascular e o influxo de neutrófilos no modelo de peritonite em camundongo (Alencar et al., 2006; Ramos et al., 2009). Essas enzimas também exibiram atividades semelhantes à trombina e plasmina, mantendo a homeostase da coagulação em camundongos infectados com *Salmonella* (Ramos et al., 2012). Um hidrogel contendo LPP2 mostrou propriedades cicatrizantes (Vasconcelos et al., 2018).

[008] A invenção trata de uma formulação fitoterápica contendo LPp2 como princípio ativo para tratamento de doença periodontal. São vantagens da invenção em relação ao estado da técnica: a) LPp2 é um produto natural biodegradável que pode ser obtido de forma mais rápida e mais barata que os produtos comercializados atualmente, após etapas simples de cromatografia e diálise; b) LPp2 não demonstra toxicidade em culturas de células (CL50 > 250 µg/mL) e/ou efeitos colaterais conhecidos em tratamentos endovenosos in vivo, em modelos animais, como observado com outras drogas comerciais, em dosagens diárias de 10 mg/Kg, equivalente a 500 mg/dia/pessoa de 50 Kg; c) LPp2 é eficiente em diminuir a expressão gênica de uma faixa ampla de mediadores inflamatórios associados a doença periodontal; d) LPp2 é mais eficiente em diminuir a área e o número de infiltrados inflamatórios, além de diminuir a reabsorção óssea em modelo animal de doença periodontal da ligadura, do que diferentes drogas comerciais; e) proteínas bioativas presentes em LPp2 possuem o potencial de serem clonadas em sistemas heterólogos.

[009] O processo de obtenção de suspensão aquosa a partir do látex seco de *C. procera* para aplicação na prevenção/tratamento de câncer foi proposta (**Pedido de Patente: PI 0510036-4 A2; US20080280995A10**), sem caracterização de princípios ativos, sendo os mesmos não associados a presença de proteases cisteínicas ou com a proposta de utilização fitoterápica do presente pedido de patente. Frações proteolíticas do látex de *C. procera* possuem potencial de aplicação na substituição de quimosina animal, utilizada na coagulação do leite caprino e bovino e produção de leite (**Pedido de Patente: BR 10 2015 012996 3 A2**), não relacionada a proposta de utilização fitoterápica do presente pedido de patente. Filamentos sedosos da planta tem sido propostos para confecção de fibras para aplicação na indústria têxtil (**Pedido de Patente: PI 0504364-6 A2**), não associada a proteases cisteínicas ou com a proposta de utilização fitoterápica do presente pedido de patente. Uma formulação contendo o conjunto solúvel de proteínas do látex de *C. procera* para tratamento de úlceras de pacientes com hanseníase foi proposta (**Pedido de Patente: BR 102018013127-3 A2**), não associada a proteases cisteínicas ou com a proposta de utilização fitoterápica do presente pedido de patente. O processo de obtenção de uma lectina isolada do látex de *Synadenium carinatum* com ação cicatrizante e anti-inflamatório foi proposto (**Pedido de Patente: PI0800567-2**), não associado a mesma espécie de planta, não associado ao mesmo processo de obtenção de

proteases cisteínicas e não associado ao mesmo tipo de princípio ativo do presente pedido de patente. Uma biomembrana de látex natural incorporada com extrato de *Stryphnodendron barbatiman* Mart. foi proposta (**Pedido de patente: BR1020170217531**), cujo o processo de preparação e possíveis princípios ativos não são associados a mesma espécie de planta, ou a proteases cisteínicas ou com a proposta de utilização fitoterápica do presente pedido de patente. Um extrato de látex de plantas da família Euphorbiaceae produzido com um solvente polar foi proposto (**Pedido de patente arquivado: PI0520394-5**), cujo o processo de preparação e possíveis princípios ativos não são associados a mesma espécie de planta, ou a proteases cisteínicas ou com a proposta de utilização fitoterápica do presente pedido de patente. Um sistema de liberação de fármacos para tratamento de doença periodontal foi proposto (**Pedido WO/2000/069362**), não relacionado a utilização de proteases cisteínicas em tratamentos endovenosos ou com a proposta de utilização fitoterápica do presente pedido de patente.

### **Breve Descrição das Figuras**

[010] A figura 1 apresenta o resultado do teste de toxicidade uma formulação contendo LPp2 com culturas de macrófagos de linhagem contínua.

[011] A figura 2 apresenta cortes histológicos do periodonto de ratos Wistar submetidos ao modelo de ligadura e tratados com LPp2. Sete dias após a periodontite induzida: grupo controle recebeu salina fosfatada (PBS) (A) ou tratado com LPp2 (B); quatorze dias após a periodontite induzida: grupo PBS (C e D) ou tratado com LPp2 (E); vinte e um dias após a periodontite induzida: grupo PBS (F) ou tratado com LPp2 (G); Dente controle sem doença periodontal (H). Coloração com hematoxilina-eosina. A, B, C, E, F e G - as setas mostram o dano tecidual na gengiva, que foi mais intenso nos grupos de PBS; D - Lacunas de Howship indicando reabsorção óssea por osteoclastos no grupo PBS; H – Gengiva saudável.

[012] A figura 3 apresenta a análise histomorfométrica de infiltrados inflamatórios na porção vestibular do dente de ratos tratados com LPp2. Os animais foram submetidos à ligadura e avaliados após 7, 14 e 21 dias nos grupos controle (Per+ / PBS) e experimental (Per+ / LPp2). Um dente do lado colateral (não submetido a ligadura) foi usado como controle por animal (Per-). \* apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo PBS ( $p < 0,0001$ ). # não apresentou diferença significativa em relação ao dente controle.

## Descrição da invenção

[013] O processo de obtenção das proteínas do látex de *Calotropis procera* estão descritos na literatura (Alencar et al., 2004; Freitas et al., 2007). O látex é coletado das partes aéreas da planta em tubos plásticos diretamente em água destilada estéril para obtenção de uma diluição 1:1 (v/v). Os tubos são centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g a temperatura de 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis do látex (LP) retidas na membrana de diálise (8000 D), realizada contra água destilada (8 °C/ 60 h), é submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sephadex, previamente equilibrada com 50 mM de tampão acetato (pH 5,0). A amostra é eluída sequencialmente com tampão contendo 0,2 e 0,3 M de cloreto de sódio (NaCl). Três picos cromatográficos distintos são produzidos e correspondem a uma fração não retida, denominada LPP1 e duas adicionais, dentro do gradiente crescente de NaCl, e denominadas LPP2 e LPP3, respectivamente. As frações são obtidas em volumes de 4 ml e recolhidas 1 ml/min. A absorvância é lida a um comprimento de onda de 280 nm. Estas cromatografias são realizadas continuamente com o objetivo de produzir quantidades satisfatórias de LPP2 que é congelada e posteriormente liofilizada. A atividade enzimática de LPP2 é confirmada in vitro com substrato específico dessa enzima, o N-benzoil-arginina-naftilamida (BANA). A amostra liofilizada constitui o “princípio ativo” cuja atividade biológica representa a reivindicação desta patente.

[014] A fração protéica LPP2, na concentração de 0,1-1% (p:v), preferencialmente 1%, foi incorporada em uma solução aquosa estabilizante (q.s.p.), contendo: NaCl (10-100 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 100 mmol L<sup>-1</sup>; Cloreto de potássio (0,019-0,19 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 0,19 mmol L<sup>-1</sup>; Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (0,027-0,27 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 0,27 mmol L<sup>-1</sup>; Fosfato de sódio monobásico (0,0125-0,125 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 0,125 mmol L<sup>-1</sup>. Esta formulação foi denominada DP-LPP2.

[015] A eficácia de um tratamento endovenoso experimental da doença periodontal com DP-LPP2 foi avaliada em ratos Wistar pesando 250-300g (Licença CEUA/UFRPE: 24/2014). A doença periodontal foi induzida com a ligadura de um fio de seda na região cervical esquerda do primeiro dente molar de cada animal, de forma a produzir um biofilme bacteriano. O dente molar colateral foi utilizado como controle adicional. Os animais foram divididos em grupos (n=5): A) Animais sem doença periodontal, sem tratamento, receberam apenas salina fosfatada

via endovenosa (Per- / PBS); B) Animais com doença periodontal, sem tratamento, receberam apenas salina fosfatada via endovenosa (Per+ / PBS); C) animais com doença periodontal, tratados com DP-LPp2, via endovenosa (Per+ / LPp2). Tecidos periodontais foram coletados após 7 (n=5/grupo), 14 (n=5/grupo) e 21 (n=5/grupo) dias do início do tratamento e submetidos a análise histológica e histomorfométrica. Não foram usados controles com drogas comerciais, pois não há tratamento padronizado para a doença periodontal, existindo diferentes mecanismos de ação associados aos tratamentos alopáticos.

[016] Sete dias após a indução da periodontite, o grupo PBS (Per+ / PBS) apresentou dano tecidual no epitélio juncional e papila gengival. Nesse grupo, todas as lâminas apresentavam piócitos e lacunas sugestivas de bolsa periodontal. Por outro lado, os animais tratados com LPp2 (Per+ / LPp2) apresentaram papila gengival e epitélio juncional preservados na maioria das lâminas. Nesse grupo, os piócitos também eram evidentes, mas sem sinais de reabsorção óssea. Após 14 dias da doença, 65% das lâminas do grupo PBS apresentavam lesão tecidual em papila gengival e epitélio juncional, enquanto 100% apresentavam piócitos e grandes fraturas teciduais, indicativas de bolsa periodontal. Além disso, lacunas de Howship foram observadas no osso alveolar, indicando ação dos osteoclastos e início da reabsorção óssea. Por outro lado, no grupo tratado com LPp2, 100% das lâminas apresentaram papila gengival preservada e 80% revelaram epitélio juncional preservado e ausência de piócitos na região periodontal. Vinte e um dias após a indução de doença periodontal, o dano tecidual no grupo PBS foi generalizado no epitélio juncional e na papila gengival, e todas as lâminas apresentavam piócitos e grandes fendas teciduais, sugestivas de bolsa periodontal. Nessas amostras, a destruição do osso alveolar ao redor do infiltrado inflamatório era evidente. No entanto, nenhum osteoclasto estava presente neste estágio. No grupo LPp2, 50% das lâminas mostraram papila gengival preservada e 35% revelaram epitélio juncional preservado. Nenhuma das amostras apresentava presença de piócitos na região periodontal ou reabsorções ósseas. As análises histomorfológicas dos dentes controle (sem doença periodontal) mostraram papila gengival e epitélio juncional normalmente preservados, e não havia sinais de células inflamatórias ou reabsorção óssea durante todo o experimento.

[017] Medidas comparativas na porção vestibular do dente impactado mostraram que no grupo tratado com LPp2, as áreas de infiltrado inflamatório foram aproximadamente 2,5; 6,0 e 5,0

vezes menores após 7, 14 e 21 dias, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle com PBS (  $p < 0,0001$ ). Do ponto de vista morfológico, os ratos tratados com LPP2 não apresentaram diferença significativa entre o dente afetado (Per+ / LPP2) e o dente controle (Per-), no mesmo animal, não apresentando infiltrado inflamatório. Os tratamentos com LPP2 reduziram significativamente o número de células inflamatórias no tecido periodontal em todos os momentos analisados em comparação com o grupo PBS ( $p < 0,0001$ ). No entanto, a inflamação não foi totalmente anulada, uma vez que um grande número de células inflamatórias ainda era evidente. Como esperado, nenhuma célula inflamatória foi observada no dente controle (Per-) em nenhum dos períodos analisados. Além disso, sete dias após a indução da doença periodontal, não houve diferença significativa na espessura do epitélio gengival no local da inflamação entre os ratos controle e experimentais. Porém, após 14 e 21 dias, o grupo tratado com LPP2 apresentou menor espessura do epitélio, que foi significativamente diferente em relação ao grupo PBS e semelhante ao dente controle, não sujeito à doença periodontal ( $p < 0,0001$ ).

## REFERÊNCIAS

- [018] Alencar, N.M., J.S. Oliveira, R.O. Mesquita, M.W. Lima, M.R. Vale, J.P. Etchells, C.D. Freitas, M.V. Ramos, Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. *Inflamm. Res.* 55(2006) 559-564.
- [019] Branco-Almeida, L.S., Influência Da Fluoxetina Sobre A Resposta Imuno-Inflamatória Relacionada À Doença Periodontal, Tese de Doutorado-Unicamp, São Paulo, 80p., 2011.
- [020] Freitas, C.D., J.S. Oliveira, M.R. Miranda, N.M. Macedo, M.P. Sales, L.A. Villas-Boas, M.V. Ramos, Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiol. Biochem.* 45(2007) 781-789.
- [021] Lins, RDAU, Pequeno MT, MELO J, Ferreira RCD, Silveira ÉJDD, Dantas EM. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac.* 2007; 7(2), 29-36

- [022] Mohamed, N. H., Ismail, M. A., Mageed, W. A., Shoreit, A.A.M., 2014. Antimicrobial activity of latex silver nanoparticles using *Calotropis procera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 876-883.
- [023] Nassar, C.A., Nassar, P.O., Nassar, P.M., Spolidorio, L.C. (2005). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. *Brazilian Oral Research*, 19(1), 36-40.
- [024] Olsen I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiol Infectious Disease*, 34(5), 877-86. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z.
- [025] Parihar, G., Balekar, N. (2016). *Calotropis procera*: A phytochemical and pharmacological review. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 115-131.
- [026] Perayil, J., Menon, K.S., Biswas, R., Fenol, A., Vyloppillil, R. (2016). Comparison of the efficacy of subgingival irrigation with 2% povidone-iodine and tetracycline HCl in subjects with chronic moderate periodontitis: A clinical microbiological study. *Dental Research Journal (Isfahan)*, 13(2), 98-109.
- [027] Preshaw, P.M. (2018). Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. , 76(1), 131-149.
- [028] Ramos, M. V., Oliveira, J. S., Figueiredo, J. G., Figueiredo, I. S., Kumar, V. L., Bitencourt, F. S., Cunha, F. Q., Oliveira, R. S., Bomfim, L. R., José Vitor Lima-Filho, J., Alencar, N. M. (2009). Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 387–392.
- [029] Ramos, M. V., Viana, C. A., Silva, A. F., Freitas, C. D., Figueiredo, I. S., Oliveira, R. S., Alencar, N. M., Lima-Filho, J. V., Kumar, V.L. (2012). Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385, 455–463.
- [030] Santos, C.F., Morandini, A.C., Dionísio, T.J., Faria, F.A., Lima, M.C., Figueiredo, C.M., Colombini-Ishikiriana, B.L., Sipert, C.R., Maciel, R.P., Akashi, A.P., Souza, G.P., Garlet,

G.P., Rodini, C.O., Amaral, S.L., Becari, C., Salgado, M.C., Oliveira, E.B., Matus, I., Didier, D.N., Greene, A.S.

[031] (2015). Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One*. 5;10(8):e0134601. doi: 10.1371/journal.pone.0134601.

[032] Tonetti, M. S., Greenwell, H., Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89, 159–172.

[033] Vasconcelos, M.S., Souza, T.F.G., Figueiredo, I.S., Sousa, E.T., Sousa, F.D., Moreira, R.A., Alencar, N.M.N., Lima-Filho, J.V., Ramos, M.V. (2018). A Phytomodulatory Hydrogel With Enhanced Healing Effects. *Phytotherapy Research*, 32(4), doi.org/10.1002/ptr.6018.

[034] Vieira-Colombo, A.P., Magalhães, C.B., Hartenbach, F.A., Martins, S.R., Maciel, S.B.C. (2016). Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial Pathogens*, 94, 27-34.

## REIVINDICAÇÕES

1. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, caracterizada por sua incorporação (0,1-1%; p:v), conjunta e homogênea, com uma solução aquosa estabilizante contendo NaCl; Cloreto de potássio; Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado e Fosfato de sódio monobásico.
2. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por solução aquosa estabilizante contendo NaCl (10-100 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 100 mmol L<sup>-1</sup>; Cloreto de potássio (0,019-0,19 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 0,19 mmol L<sup>-1</sup>; Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (0,027-0,27 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 0,27 mmol L<sup>-1</sup>; Fosfato de sódio monobásico (0,0125-0,125 mmol L<sup>-1</sup>), preferencialmente 0,125 mmol L<sup>-1</sup>.
3. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL no tratamento endovenoso, preferencialmente, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela presença de atividade proteolítica, conforme determinado em ensaio in vitro com substrato específico N-benzoil-arginina-naftilamida (BANA).
4. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela ausência de contaminantes microbianos (bactérias e fungos), conforme determinado por ensaio de cultivo microbiológico em meios de cultura (ágar nutriente e ágar Sabouraud).
5. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ausência de toxicidade em culturas de macrófagos (CL50 > 250 µg/mL).

6. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela ausência de sintomas clínicos de toxicidade in vivo em ratos Wistar, em dosagens de até 10mg/Kg.
7. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela inibição da expressão gênica de citocinas inflamatórias, tais como, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, como determinado em ensaio in vitro com culturas de macrófagos estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS).
8. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela capacidade de redução de células e infiltrados inflamatórios nos tecidos afetados.
9. FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela capacidade de reduzir a reabsorção óssea nos tecidos afetados.

## DESENHOS

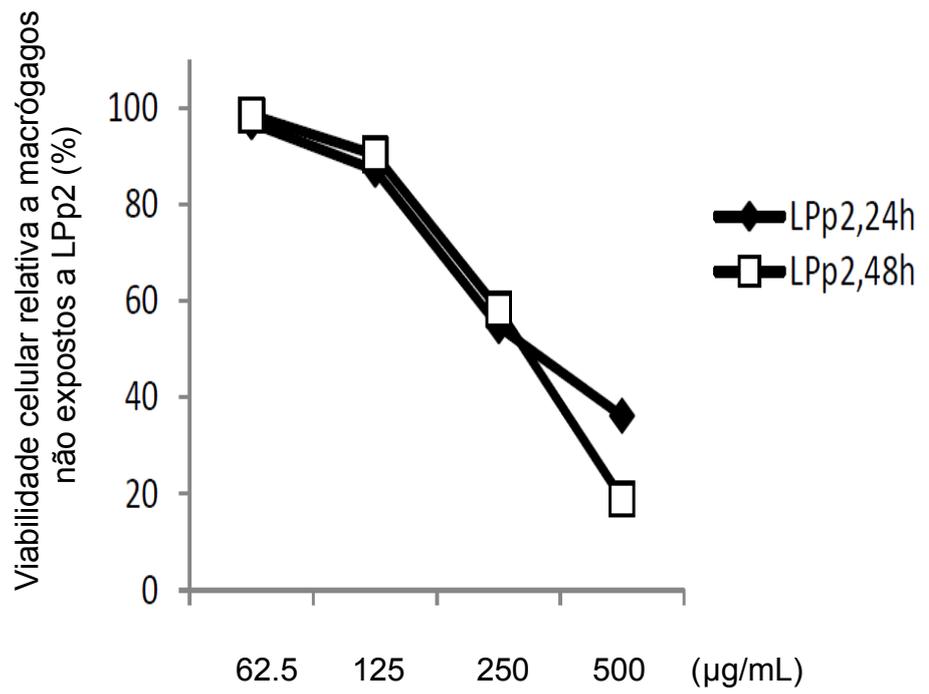


Figura 1

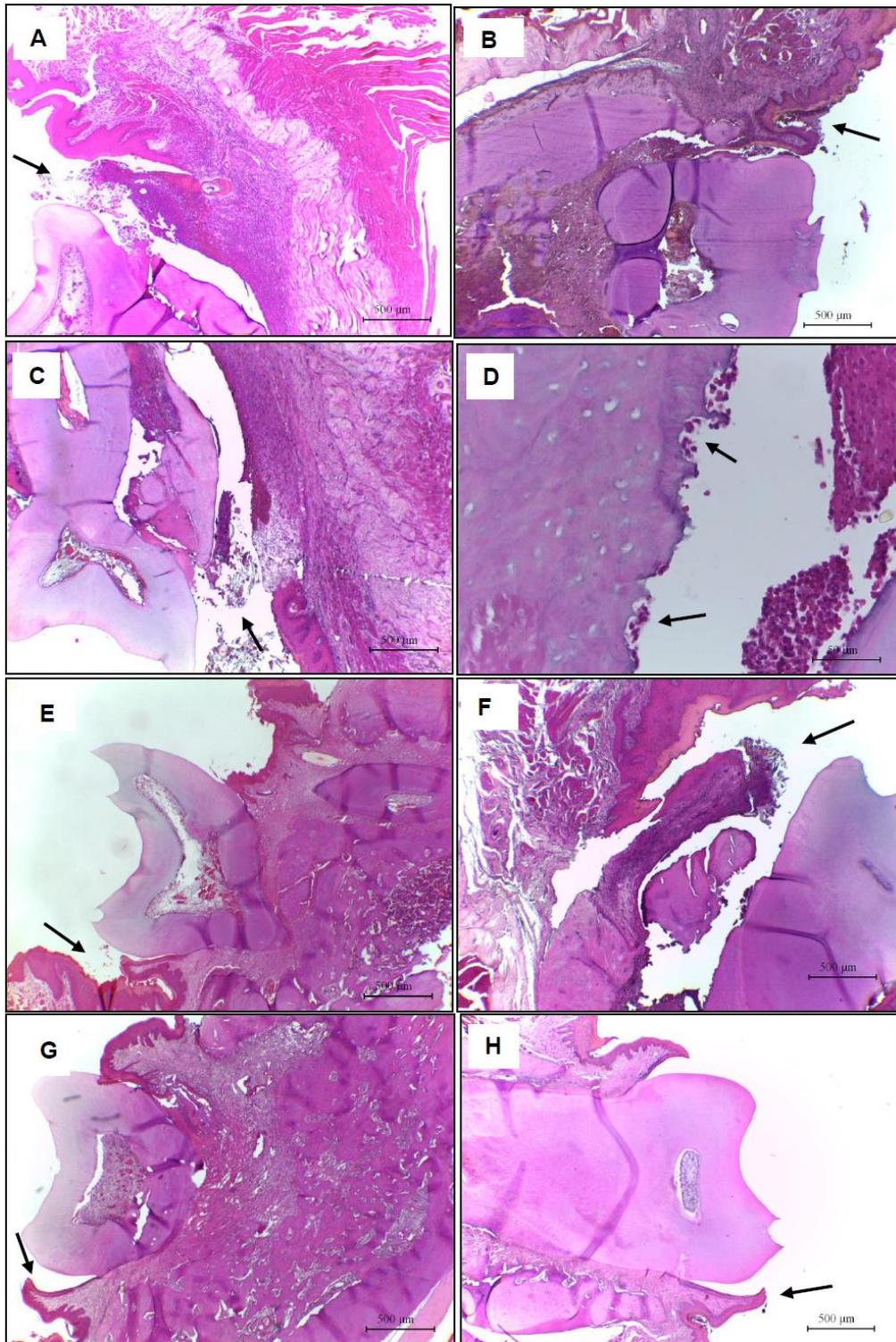


Figura 2

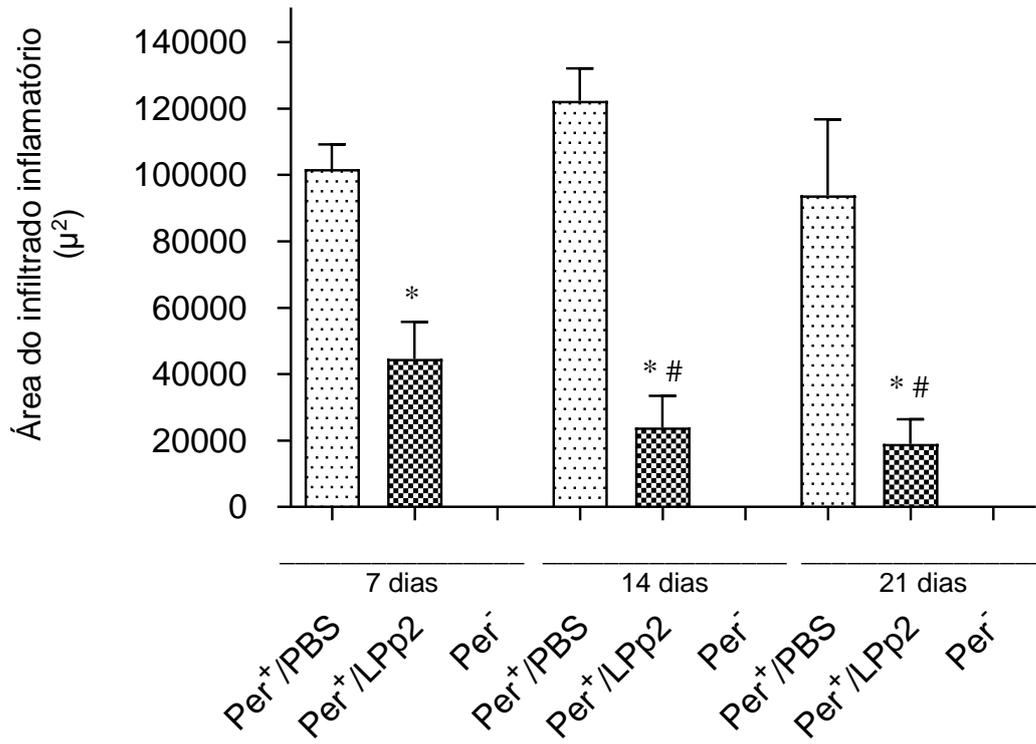


Figura 3

**RESUMO****FITOTERÁPICO À BASE DE PROTEASES CISTEÍNICAS OBTIDAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera*  
PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL**

A presente invenção trata de uma formulação fitoterapêutica denominada DP-LPp2, cujo setor técnico é a indústria farmacêutica, para tratamento de doença periodontal infecciosa bacteriana que contém como princípio ativo extratos protéicos ricos em proteases cisteínicas obtidos do látex da planta *Calotropis procera*. DP-LPp2 contém princípios ativos biodegradáveis e, portanto não recalcitrantes na natureza; pode ser obtido de forma mais rápida e mais barata que drogas alopáticas; não apresenta demonstrada toxicidade em culturas de células e/ou efeitos colaterais conhecidos em tratamentos endovenosos in vivo, em modelos animais, como observado com outras drogas comerciais; é eficiente em diminuir a expressão gênica de uma faixa ampla de mediadores inflamatórios associados a doença periodontal; é eficiente em diminuir a área e o número de infiltrados inflamatórios, além de diminuir a reabsorção óssea em modelo animal de doença periodontal; proteínas bioativas presentes possuem o potencial de serem clonadas em sistemas heterólogos.