



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CAMPUS MARCO ZERO DO EQUADOR  
CURSO DE FISIOTERAPIA**

**DANNA EMANUELLE SANTOS GONÇALVES**

**JOELMA APARECIDA ARAUJO**

**Nanogel do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.  
associado à fonoforese: efeito modulador sobre a lesão muscular  
induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni*.**

**Orientador:** Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

**MACAPÁ-AP**

**2023**

**DANNA EMANUELLE SANTOS GONÇALVES**

**JOELMA APARECIDA ARAUJO**

**Nanogel do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.  
associado à fonoforese: efeito modulador sobre a lesão muscular  
induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni*.**

Defesa do trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de Fisioterapia, do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

**Orientador:** Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

**MACAPÁ-AP**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP  
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

---

G635 Gonçalves, Danna Emanuelle Santos.

Nanogel do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. associado à fonoforese: efeito modulador sobre a lesão muscular induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni* / Danna Emanuelle Santos Gonçalves, Joelma Aparecida Araujo. - Macapá, 2023.  
1 recurso eletrônico. 51 folhas.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Fisioterapia, Macapá, 2023.  
Orientador: José Carlos Tavares Carvalho.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. *Rosmarinus officinalis*. 2. Veneno de serpente. 3. Fonoforese. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador. II. Araujo, Joelma Aparecida. III. Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

CDD 23. ed. – 615.82

---

GONÇALVES, Danna Emanuelle Santos, ARAUJO, Joelma Aparecida. **Nanogel do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. associado à fonoforese:** efeito modulador sobre a lesão muscular induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni*. Orientador: José Carlos Tavares Carvalho. 2023. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Coordenação do Curso de Fisioterapia. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2023.

**DANNA EMANUELLE SANTOS GONÇALVES**

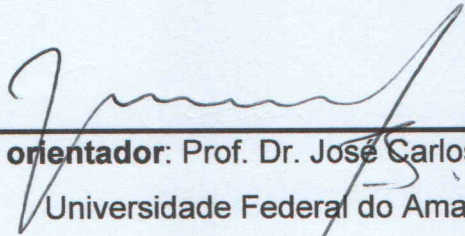
**JOELMA APARECIDA ARAUJO**

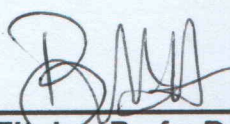
**Nanogel do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.  
associado à fonoforese: efeito modulador sobre a lesão muscular  
induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni*.**

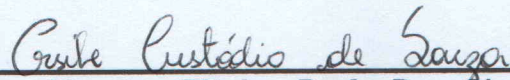
Defesa do trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de Fisioterapia, do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

**Data de aprovação 12/05/2023**

**Banca Examinadora**

  
\_\_\_\_\_  
**Presidente e orientador:** Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho  
Universidade Federal do Amapá

  
\_\_\_\_\_  
**Membro Titular:** Profa. Dra. Beatriz Martins de Sá Hyacienth  
Universidade Federal do Amapá

  
\_\_\_\_\_  
**Membro Titular:** Profa. Dra. Gisele Custódio de Souza  
Universidade Federal do Amapá

## **AGRADECIMENTOS**

De Danna,

Agradeço a Deus por iluminar minha mente nos momentos difíceis e por todas as benções recebidas.

Agradeço a minha família, que me apoiou em tudo o que eu decidi fazer até hoje e por aguentarem minha ausência nos encontros familiares.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho a quem tenho muito orgulho e honra em ter sido orientanda.

Ao meu companheiro de vida Helison de Oliveira Carvalho, que esteve presente sempre que necessitei, me auxiliando e contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho, me incentivando e acompanhando em todo o processo.

Agradeço a todos meus amigos com quem compartilho minhas alegrias e angustias e que tornaram toda essa jornada mais leve e meus dias mais felizes, em especial à Joelma Aparecida Araujo.

Por fim, agradeço a todos que participaram da pesquisa no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, pela colaboração e disposição no processo de obtenção de dados e por quem tive o privilégio de conviver dia-a-dia durante a graduação.

De Joelma,

Agradeço em primeiro lugar, a Deus por ter permitido que eu tivesse saúde, força e determinação para não desistir no meio do caminho, por me permitir essa realização.

Agradeço aos meus familiares e amigos, em especial aos meus filhos: Jessica Araújo e Luis Otávio Araújo e meus amigos Danna Gonçalves e Helison Carvalho, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade e pelo apoio demonstrado ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho quem auxiliou na elaboração deste trabalho

Aos meus mestres, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                             | <b>08</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                                                              | <b>11</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral.....</b>                                                                                                       | <b>11</b> |
| <b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>                                                                                                | <b>11</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                     | <b>12</b> |
| <b>3.1 Obtenção do óleo essencial de <i>R. Officinalis</i> (OERO).....</b>                                                           | <b>12</b> |
| <b>3.2 Análise química do OERO por CG-MS.....</b>                                                                                    | <b>12</b> |
| <b>3.3 Obtenção, caracterização e estabilidade da nanoemulsão (NAE).....</b>                                                         | <b>12</b> |
| <b>3.4 Incorporação da NAE em Gel de Carbômero.....</b>                                                                              | <b>13</b> |
| <b>3.5 Considerações éticas, animais utilizados e obtenção do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (VBm).....</b>                       | <b>13</b> |
| <b>3.6 Delineamento experimental e lesão muscular induzida por VBm no músculo gastrocnêmio dos ratos.....</b>                        | <b>14</b> |
| <b>3.7 Avaliação dos níveis de CK e mioglobina do sangue coletado dos animais.....</b>                                               | <b>14</b> |
| <b>3.8 Eutanásia, quantificação de leucócitos e avaliação histopatológica da lesão Induzida por VBm no músculo gastrocnêmio.....</b> | <b>15</b> |
| <b>3.9 Análise estatística dos resultados.....</b>                                                                                   | <b>15</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                 | <b>16</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                              | <b>24</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                              | <b>25</b> |
| <b>ANEXO 1 – Comitê de Ética.....</b>                                                                                                | <b>29</b> |
| <b>ANEXO 2 – Comprovante de submissão do artigo.....</b>                                                                             | <b>30</b> |
| <b>ANEXO 3 – Artigo Científico.....</b>                                                                                              | <b>31</b> |

## RESUMO

O veneno da *B. moojeni* (VBm) contém toxinas, que apresentam efeitos tóxicos locais desencadeando pronunciado processo inflamatório, dor, hemorragia, edema e mionecrose. A fonoforese é uma técnica que utiliza o ultrassom terapêutico (UST) associado a um agente com propriedades farmacológicas, essa associação possibilita a otimização de sistemas que veiculam drogas em nanoformulações. A *Rosmarinus Officinalis* é uma planta que apresenta efeito anti-inflamatório, analgésico e antioxidante. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito modulador da aplicação do nanogel de *R. officinalis* associado à fonoforese sobre a lesão muscular induzida por VBm em ratos wistar. Os resultados químicos demonstraram majoritariamente aos compostos Limoneno (5,08 %), 1,8 Cineol (35,28%) e Canfora (46,92 %). A nanoemulsão (NAE) apresentou estabilidade com diâmetro de gota média entre  $213 \pm 2.1$  (1º dia) a  $153.9 \pm 2.7$  nm (30º dia), com índice de polidispersão variando entre  $0.10 \pm 0.001$  e  $0.13 \pm 0.01$ . O nanogel foi preparado a partir da NAE em hidrogel de carbopol. Foi aplicado 0,10 mg/kg de VBm para produzir a inflamação no músculo gastrocnêmio. Na evolução do volume do edema, evidenciou que os grupos tratados com UST ( $p < 0.01$ ), fonoforese com Dexametasona 0,5 mg/kg ( $p < 0.001$ ) e nanoemulsão 0,5 mg/kg ( $p < 0.001$ ) apresentaram efeito anti-edematogênico significativo. Além de que, foram capazes de reduzir os níveis de CK e mioglobina, recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão. Os achados histopatológicos reforçaram o efeito anti-inflamatório com diminuição dos danos musculares e mionecrose. Portanto, sugere-se que foi possível demonstrar a efetividade modulatória sobre o processo inflamatório e lesão muscular induzida pelo VBm, tanto com tratamento com UST quanto com a fonoforese associada ao nanogel de *R. officinalis*, além disso, foi demonstrado a capacidade dos tratamentos em atenuar os danos teciduais e incrementar o reparo.

**Palavras-chave:** *Rosmarinus officinalis*; Veneno de serpente; Fonoforese; anti-inflamatório; Lesão muscular; Dano tecidual.

## ABSTRACT

The venom of *B. moojeni* (VBm) contains toxins that induce local toxic effects, triggering a severe inflammatory process, pain, hemorrhage, edema, and myonecrosis. Phonophoresis is a technique that uses therapeutic ultrasound (TUS) associated with an agent with pharmacological properties, optimizing drug delivery systems in nanoformulations. *Rosmarinus officinalis* is a plant with anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant effects. Therefore, this study aimed to evaluate the modulatory effect of the application of *R. officinalis* nanogel associated with phonophoresis on VBm-induced muscle injury in Wistar rats. The chemical results demonstrated predominantly Limonene (5.08%), 1,8 Cineole (35.28%), and Camphor (46.92%) compounds. The nanoemulsion (NAE) exhibited stability with a mean drop diameter ranging from  $213 \pm 2.1$  (1st day) to  $153.9 \pm 2.7$  nm (30th day), with a polydispersity index ranging from  $0.10 \pm 0.001$  to  $0.13 \pm 0.01$ . The nanogel was prepared from NAE in a carbopol hydrogel. A dose of 0.10 mg/kg of VBm was applied to induce inflammation in the gastrocnemius muscle. The evolution of edema volume showed that the groups treated with TUS ( $p < 0.01$ ), phonophoresis with Dexamethasone 0,5 mg/kg ( $p < 0.001$ ), and nanoemulsion 0,5 mg/kg ( $p < 0.001$ ) presented a significant anti-edematogenic effect. Moreover, they were able to reduce CK and myoglobin levels and the recruitment of inflammatory cells to the injury site. Histopathological findings reinforced the anti-inflammatory effect with decreased muscle damage and myonecrosis. Therefore, it is suggested that the modulatory effectiveness on the inflammatory process and muscle injury induced by VBm was demonstrated, both with TUS treatment and with phonophoresis associated with *R. officinalis* nanogel. Furthermore, the treatments were shown to attenuate tissue damage and enhance repair.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*, snake venom, phonophoresis, anti-inflammatory, Tissue injury, Muscle damage.

## 1 INTRODUÇÃO

Anualmente ocorrem mais de 2,5 milhões de acidentes ofídicos em todo o mundo, que representam um grave problema de saúde pública em várias regiões, particularmente em países de clima tropical e subtropical da região amazônica, como o Brasil, onde serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 87% do total destes acidentes (CAPELETTI et al., 2016; FELIZ-SILVA et al., 2017). As vítimas mais afetadas são moradores de localidades endêmicas, geralmente são trabalhadores de áreas rurais, caçadores e indivíduos que entram em locais de mata fechada, sítios e fazendas, carecendo de roupas apropriadas para proteção (SALVADOR et al., 2020).

As serpentes do gênero *Bothrops* pertencem à família Viperidae e são as espécies mais amplamente distribuídas na América Latina. A *Bothrops moojeni* é uma serpente conhecida no Brasil por diversos nomes, tais como "caiçaca", "jararacão" ou "jararaca" e "comboia", é frequentemente encontrada em regiões quentes e secas (ALCÂNTARA et al., 2018). O veneno da *B. moojeni* (VBm) contém uma variedade de toxinas (enzimas), incluindo fosfolipase A2 (PLA2), metaloproteinases (SVMPs), serino-proteinases, hialuronidases, entre outras que podem produzir as ações biológicas (MENALDO et al., 2017; AGUIAR et al., 2019).

O VBm apresenta efeitos tóxicos locais que incluem pronunciado processo inflamatório, dor, hemorragia, edema e mionecrose no local da picada, que dependendo da intensidade, pode levar à necrose de tecidos profundos, danos sistêmicos e letalidade (CARVALHO et al., 2018). A resposta inflamatória induzida pelo VBm, é formada primariamente por um intenso edema, produzido por fatores como a ação direta de componentes do veneno na microvasculatura, aumentando a permeabilidade dos capilares, recrutamento de células inflamatórias e exacerbação da produção de mediadores endógenos como histamina, prostaglandinas, cininas e outros agentes pró-inflamatórios (SUNITHA et al., 2015; PICANÇO et al., 2016).

Em um acidente ofídico, o mecanismo de resposta inflamatória não é neutralizado completamente após administração do soro antibotrópico, resultando em pronunciado dano tecidual no local da inoculação do veneno, principalmente quando administrado tardiamente. Para minimizar os efeitos locais provocados pelo veneno, é necessário a complementação com medicamentos anti-inflamatórios e outras terapias (PICCOLO et al., 2002; FONSECA et al., 2004).

O ultrassom terapêutico (UST) é um recurso não-invasivo usualmente empregados na rotina fisioterapêutica, apresenta-se como destaque no tratamento para reparação de lesões teciduais (MARTINS et al., 2011). O UST utiliza ondas ultrassônicas através de um transdutor promovendo energia sonora longitudinal que penetra nos tecidos biológicos, e é capaz de produzir alterações celulares por efeitos mecânicos e térmicos. Estes efeitos aumentam o metabolismo celular, o fluxo sanguíneo, o suprimento de oxigênio, permeabilidade e temperatura local (OLSSON et al., 2008).

A fonoforese é uma técnica que utiliza o UST associado a um agente com propriedades farmacológicas, essa associação possibilita a permeação do fármaco e favorece sua passagem transcutânea. O uso da fonoforese, em aplicações tópicas permite aumento da permeabilidade da membrana celular, diminuindo a resistência cutânea, aumento do fluxo sanguíneo possibilitando maior penetração dos agentes farmacológicos facilitando a sua absorção (LIMA et al., 2020). Têm sido propostos avanços terapêuticos que envolvem a associação da fonoforese combinada com nanoformulações com a finalidade de potencializar os efeitos terapêuticos e levar a melhoria das vias de absorção e administração de drogas aos tecidos-alvo (DOS SANTOS HAUPENTHAL et al., 2020).

Os efeitos terapêuticos podem ser otimizados quando se utiliza sistemas que veiculam drogas em nanoformulações. As nanoformulações são formas farmacêuticas que transportam fármacos em escalas nanométricas, geralmente menor que 300 nm, o uso destas formulações pode melhorar seu índice terapêutico e reduzir propriedades tóxicas, melhorando a farmacocinética, biodistribuição e eficácia (ASSIS et al., 2012; PATRA et al., 2018). As nanoemulsões são uma classe de nanoformulações contendo sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis, contendo uma fase aquosa e uma oleosa estabilizadas por um agente tensoativo (OSTERTAG et al., 2012). Apresentam como vantagens, maior estabilidade, maior poder de penetração nas membranas biológicas, melhor biodisponibilidade e solubilidade, favorecendo aumento do potencial terapêutico (IRACHE et al., 2011).

A *Rosmarinus officinalis* L. é uma planta perene popularmente conhecida como “alecrim”, é originária das regiões mediterrâneas e pertencente à família Lamiaceae. A *R. Officinalis* é cultivada mundialmente por conta de suas propriedades nutricionais e farmacológicas (RODRIGUES et al., 2020; COSME et al., 2022). Da *R. Officinalis* é extraído o óleo essencial (OERO), que possui composição química rica em

monoterpenos, como o 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, limoneno e canfora (TAKAYAMA et al., 2016). Estudos prévios vêm comprovando o significativo efeito anti-inflamatório, analgésico e antioxidante relacionado ao OERO e a sua nanoemulsão em modelos experimentais (TAKAKI et al., 2008; BORGES et al., 2018; BORGES et al., 2019).

Diante da relevante atividade anti-inflamatório atribuída ao OERO e sua nanoemulsão, assim como da necessidade de criação de abordagens terapêuticas efetivas que venham minimizar os efeitos inflamatórios e os danos teciduais provocados por acidentes ofídicos. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório da aplicação do nanogel de *R. officinalis* associado à fonoforese em lesão muscular induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni* em ratos wistar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório da aplicação do nanogel de *R. officinalis* associado à fonoforese em lesão muscular induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni* em ratos wistar.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição química do óleo essencial de *R. officinalis*;
- Realizar o preparo, caracterização e estabilidade da nanoemulsão do óleo essencial da *R. officinalis*;
- Preparar um nanogel para aplicação associado à fonoforese a partir do óleo essencial de *R. officinalis*;
- Avaliar o efeito do nanogel associado a fonoforese sobre lesão muscular induzida por veneno da serpente *Bothrops moojeni* em músculos de ratos wistar através de marcadores de lesão muscular e análise histopatológica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do óleo essencial de *R. Officinalis* (OERO)

O OERO (Lote 056757-LC02062016DA.) foi adquirido da Empresa Florien (São Paulo, Brasil). De acordo com o certificado de qualidade da empresa, o OERO foi extraído das folhas da espécie *R. Officinalis*.

#### 3.2 Análise química do OERO por CG-MS

A análise da composição química do OERO foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), onde 100 µL de OERO foi solubilizados em 2 ml de Hexano grau CG-MS. As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu / GC-2010, auto-injetor Shimadzu / AOC-5000 e detector de massa (Shimadzu MS2010 Plus) com impacto eletrônico (70 eV) equipado com uma coluna de sílica fundida de DB-5MS (Agilent Advanced J & W; 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Os parâmetros foram os seguintes: relação de divisão 1:30; Hélio como gás de arraste (65 kPa); volume de injeção de 1,0 µl; Temperatura do injetor em 250 °C; temperatura do detector, 250 °C; temperatura inicial da coluna, 60 °C durante 1 min; taxa de aquecimento, 3 °C min<sup>-1</sup> a 290 °C. O tempo de análise total foi de 41,30 minutos. A identificação dos compostos foi realizada através do padrão de fragmentação dos compostos comparado com a biblioteca de espectro de massa contida no equipamento NIST 5.0 (RODRIGUES et al., 2020).

#### 3.3 Obtenção, caracterização e estabilidade da nanoemulsão (NAE)

A nanoemulsão (NAE) foi preparada usando técnica de baixo aporte de energia, seguindo a metodologia descrita por BORGES et al., (2018). Para uma massa final de 20 g, foi utilizado 90% de água, 5% de OERO e 5 % de Tween 20. Inicialmente, uma fase foi preparada adicionando OERO e Tween 20, a mistura foi agitada usando um agitador magnético (750 rpm) por 30 min. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada a uma taxa de fluxo de 5,0 mL/min com agitação constante por 60 min. A estabilidade da nanoemulsão foi avaliada no 1º, 7º, 14º e 30º dias após a preparação, utilizando análise macroscópica de cor, aspecto visual, separação de

fases e sedimentação. O tamanho das partículas e índice de polidispersão foram avaliados através de aparelho Zetasizer 5000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). A NAE foi diluída usando água ultrapura Milli-Q (1:25), e as medidas foram realizadas em triplicata e os valores expressos como média e desvio padrão.

### 3.4 Incorporação da NAE em Gel de Carbômero

O gel de Carbômero (Carbopol®) foi preparado empregando uma fase A: Metilparabeno (0,3 %), Propilparabeno (0,2%), Propilenoglicol (4 %); fase B: Carbopol® (2 %), Água destilada (93.5 %). Foram aquecidos os componentes das fases A e B, logo em seguida as fases foram misturadas lentamente com auxílio de agitador mecânico até obtenção de aspecto e característica de gel base, a correção do pH para 6,5 foi realizado utilizando trietanolamina. Foi pesado 10 g (20%) de NAE e acrescentou-se 40 g (80%) de gel Carbopol® que ficou sob agitação magnética (750 rpm) por 120 min, para formar uma formulação final de 50 g. A determinação da proporção gel/NAE foi verificada previamente pela característica macroscópica do nanogel formado, separação de fases, aspecto, cor, odor, espalhabilidade tópica, deslizamento e acoplamento do transdutor do ultrassom em temperatura ambiente (Alves Barros et al., 2017; Lima et al., 2020).

### 3.5 Considerações éticas, animais utilizados e obtenção do veneno de *Bothrops moojeni* (VBm)

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá, CEUA-UNIFAP, e foi aprovado em 03 de novembro de 2022, sob o Protocolo nº 020/2022.

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório CEMIB – Universidade de Campinas, UNICAMP, com 21 dias de idade. Durante o estudo, os animais foram alojados em caixa de polietileno com grades inox, medindo 60 cm × 50 cm × 22 cm. Foram mantidos em ambiente climatizado, os quais ficaram por um período de ambientação, agrupados em grupo de cinco animais por caixas, mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm ^\circ\text{C}$ ), com livre acesso à alimentação e água potável, com ciclos claro/escuro de 12 horas e troca de

maravalha, no Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá.

O VBm utilizado neste estudo foi liofilizado e obtido do *Serpentarium* da Universidade de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil. O veneno foi dissolvido em solução veículo e injetado imediatamente nos animais durante o ensaio.

### **3.6 Delineamento experimental e lesão muscular induzida por VBm no músculo gastrocnêmio dos ratos**

A lesão no músculo gastrocnêmio foi realizado como previamente descrito por (Carvalho et al., 2021). Em que 0,10 mg/kg do veneno de *B. Moojeni* (VBm) foi diluído em 100 µl de solução salina estéril e posteriormente administrada no músculo esquerdo dos ratos. Após a aplicação do veneno, os animais foram tratados diariamente durante 6 dias por via tópica com aplicação do ultrassom terapêutico (UST) ou fonoforese como descrito abaixo.

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=5), sendo o grupo de animais normais (**NOR**), o único grupo que não recebeu tratamento e não teve lesão induzida pelo VBm; Grupo controle não-tratado (**NTD**); Grupo ultrassom terapêutico (**UST**); Grupo tratado com fonoforese de dexametasona com dose de 0,5 mg/kg em gel (**DEX**); Grupo tratado com fonoforese do nanogel da NAE com dose de 0,5 mg/kg (**NAE**). Os parâmetros do ultrassom terapêutico (UST) e fonoforese, foram: frequência de 1 MHz, pulsado a 20%, intensidade de 0,6 W/cm<sup>2</sup> e área de radiação efetiva (ERA) de 3 cm<sup>2</sup> (Dos Santos Haupenthal et al., 2020). A aplicação foi diretamente na região central do gastrocnêmio com movimentos lentos, circulares e uniformes. Utilizou-se o equipamento Sonopulse Special Ibramed (Imbramed Company, Brasil).

### **3.7 Avaliação dos níveis de CK e mioglobina do sangue coletado dos animais**

No 7º dia os animais foram anestesiados e realizado coleta de 1,0 ml de sangue do plexo retro-orbital, posteriormente o sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 5.000 rpm, em seguida foi realizado a quantificação dos níveis séricos de creatina quinase total (CK) empregando kit CK-NAC Liquiform (Labtest, Minas Gerais, Brasil). As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS model UVmini-

1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Para a análises dos níveis de mioglobina foi realizado utilizando as instruções dos kits reagentes APOTI™ (Acro Biotech Inc. California, EUA).

### **3.8 Eutanásia, quantificação de leucócitos e avaliação histopatológica da lesão Induzida por VBm no músculo gastrocnêmio**

Após a coleta, os animais foram eutanaseados com overdose de tiopental 3 vezes a dose terapêutica (40 mg/kg), em seguida o músculo gastrocnêmio foi removido e pesado em balança analítica (Bel, Modelo: M214AIH, São Paulo, Brasil), sendo uma parte separada para histopatologia e 400 mg foi triturado com auxílio de uma lâmina de bisturi e homogeneizados em 2 mL de PBS. A suspensão foi incubada por 30 min, posteriormente foi filtrada com gaze. A fração da solução filtrada foi diluído em líquido de Turk (1:20) para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

As amostras de músculo gastrocnêmio para as análises histopatológicas foram preparadas segundo a técnica descrita por CARVALHO et al., (2018), onde as amostras foram armazenadas em formaldeído a 10% e, posteriormente, foram desidratadas sucessivamente em álcoois graduados de 70, 80, 90 e 100%, foram clarificados com xilol e emblocados em parafina a 60 °C. As amostras de tecidos foram seccionadas com espessura de 5 µm com auxílio de micrótomo rotativo semi-automático (modelo CUT 5062 SLEE), posteriormente os cortes foram coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (H/E). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus (Modelo: CX31trinocular) em objetiva de 40X, onde foram observados focos de infiltrado inflamatório no músculo, fibras musculares íntegras e com mionecrose (SOUSA et al., 2013).

### **3.9 Análise estatística dos resultados**

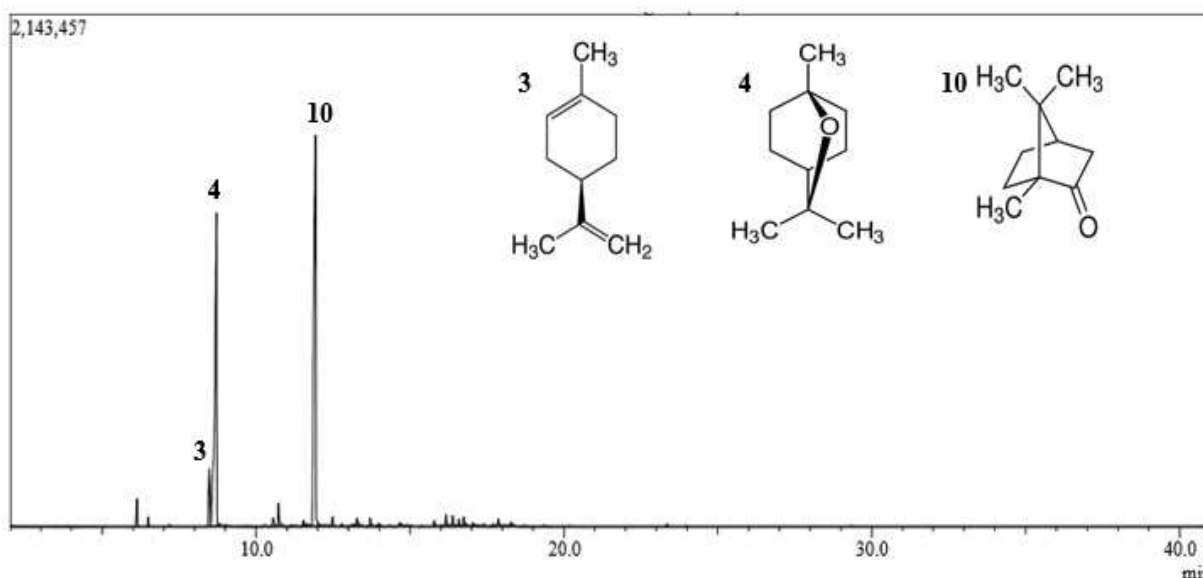
Os valores foram apresentados como média e desvio padrão. Foram realizados análise de variância (ANOVA One-way) seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações. Resultados que apresentaram diferenças de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos entre os grupos.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação a análise química do OERO por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), foi possível realizar a integração e identificação dos picos comparando os espectros de fragmentação com a biblioteca do CG-MS, sendo possível identificar 14 compostos terpênicos presentes no OERO representando 93.82 % dos compostos, correspondendo majoritariamente aos compostos Limoneno com percentual de 5,08 %, 1,8 Cineol com 35,28% e Canfora com 46,92 % (**Figura 1 e Tabela 1**).

Esses resultados químicos corroboram com os encontrados por outros autores, que reportam concentrações elevadas de Canfora e 1,8 Cineol no OERO, com valores variando entre 15 % a 45 % (FERNANDES et al., 2013; BORGES et al., 2018). Nos estudos realizados por Duarte et al., (2015) e SATYAL et al., (2017) com o OERO, destacam-se como principais constituintes os monoterpenos cânfora, 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, limoneno.

**Figura 1-** Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas (CG-MS) da análise de OERO, onde: **Pico 3** - Limoneno (5,08%), **Pico 4** - 1,8-cineol (35,28%) e **Pico 10** - Cânfora (46,92 %).



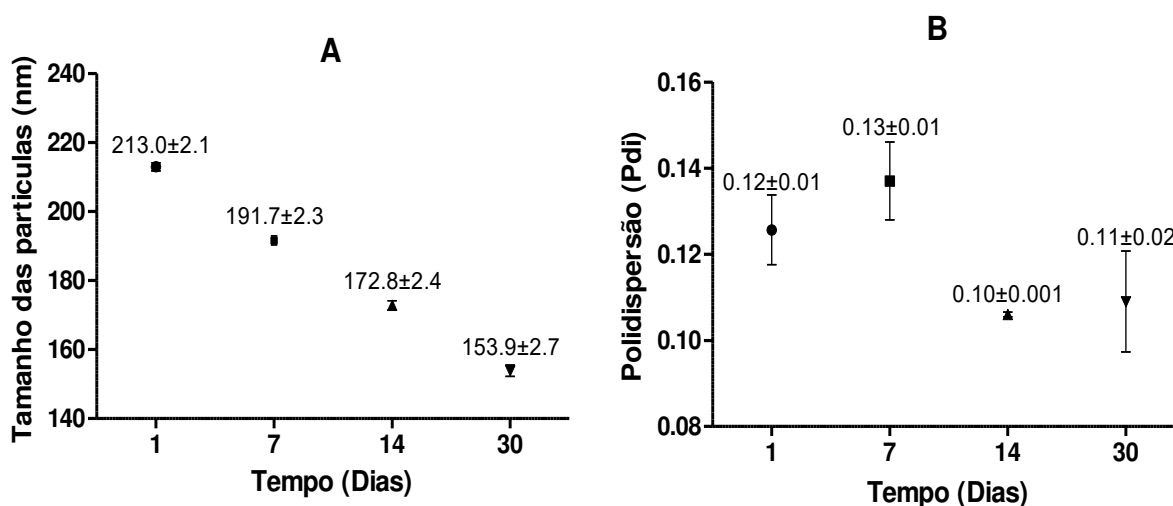
**Tabela 1** - Constituintes químicos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) determinado por análise GC-MS. Tr (Tempo de retenção em minutos).

| Pico                      | Composto             | Tr (min) | Percentual (%) |
|---------------------------|----------------------|----------|----------------|
| 1                         | $\beta$ -mirceno     | 6.122    | 1.67           |
| 2                         | o-cimeno             | 6.490    | 0.56           |
| 3                         | Limoneno             | 8.474    | 5.08           |
| 4                         | 1,8 Cineol           | 8.708    | 35.28          |
| 5                         | $\alpha$ -Terpineno  | 10.549   | 0.70           |
| 6                         | Terpinoleno          | 10.728   | 1.56           |
| 7                         | $\gamma$ -Terpineno  | 11.188   | 0.11           |
| 8                         | $\beta$ -linalol     | 11.531   | 0.41           |
| 9                         | **                   | 11.639   | 0.23           |
| 10                        | Canfora              | 11.927   | 46.92          |
| 11                        | Borneol              | 12.478   | 0.62           |
| 12                        | $\alpha$ -terpineol  | 12.791   | 0.12           |
| 13                        | $\alpha$ -canfolenal | 13.171   | 0.15           |
| 14                        | Verbenona            | 13.277   | 0.55           |
| 15                        | $\beta$ -cariofileno | 13.345   | 0.09           |
| <b>Total identificado</b> |                      |          | <b>93.82</b>   |

\*\*Não identificado.

A partir do OERO, foi obtida a nanoemulsão (NAE) preparada do óleo essencial de *R. officinalis*, em seguida, foi avaliado a sua estabilidade durante 30 dias, no decorrer do período, a NAE não apresentou alterações como separação de fases e mudanças na coloração (branca/opaca). Além disso, foi observado que o diâmetro da gota média variou entre  $213 \pm 2.1$  (1º dia) a  $153.9 \pm 2.7$  nm (30º dia), com índice de polidispersão variando entre  $0.10 \pm 0.001$  e  $0.13 \pm 0.01$  no mesmo período de estudo (Figura 2).

**Figura 2** - Análise da estabilidade da nanoemulsão de *R. officinalis* (NAE) ao longo de 30 dias. (A) média da variação do tamanho das partículas, (B) Média da variação de polidispersão.



Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os relatados em outras trabalhos, onde é descrito que a estabilidade a longo prazo das nanoemulsões dependem em parte do tamanho das gotículas formadas, pois nanoemulsões com gotículas relativamente grande, acima de 590 nm, perdem facilmente a estabilidade. Por outro lado, nanoemulsões com gotículas menores permanecem estáveis por grandes períodos, sem haver separação de fases, coalescência, agregação ou cremação (MIKULCOVA et al., 2017; KARTHIK et al., 2017). Em estudos realizado Fernandes et al (2013) e Duarte et al (2015), corrobora com nossos resultados, ao obter nanoemulsões do óleo essencial de *R. officinalis* estáveis com diâmetro médio das gotículas variando entre 97,12 a 237,8 nm e baixa polidispersão.

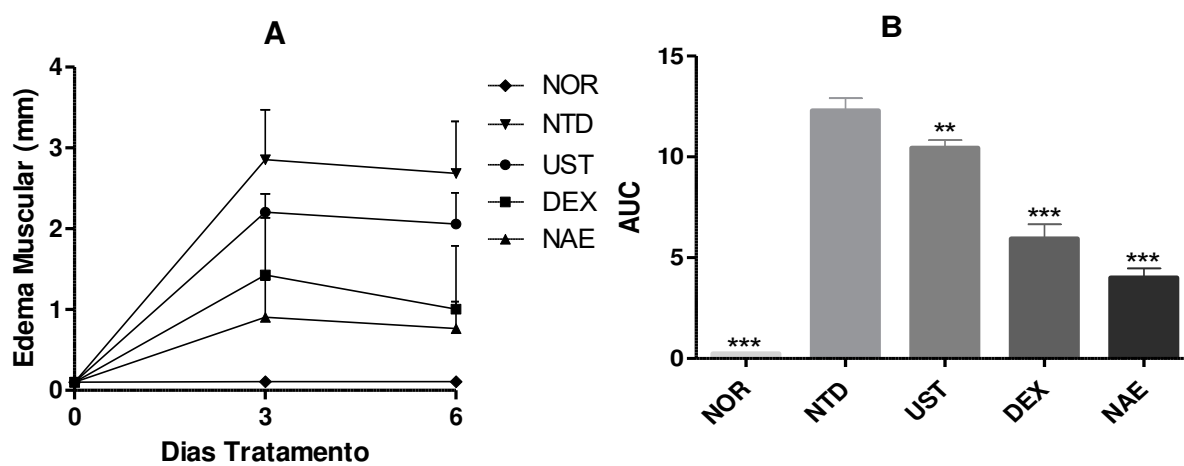
Após a avaliação da estabilidade da NAE, procedeu-se para incorporação em gel, como a natureza líquida da NAE dificulta a aplicação tópica com a fonoforese, optou-se por combiná-la com hidrogel para aumentar sua viscosidade e possibilitar a aplicação tópica pela via associada às ondas ultrassônicas. A concentração final da formulação, resultou em 20% de NAE em gel de Carbopol®, a formulação não apresentou separação de fases ou alterações que indicassem perda de estabilidade ao longo dos testes, e facilitou o deslizamento do transdutor do ultrassom no local da aplicação.

O veneno de serpentes do gênero *Bothrops* caracteriza-se por provocar um processo inflamatório acelerado na área inoculada, resultando inicialmente em edema intenso. Isso é causado por vários fatores, incluindo a ação direta dos componentes do veneno na microvasculatura, aumento da permeabilidade e exacerbação dos efeitos dos mediadores endógenos, como histamina, prostaglandinas e outras substâncias pró-inflamatória (SUNITHA et al., 2015).

Neste estudo, a aplicação do veneno de *B. moojeni* na dose de 0,10 mg/kg para produzir a inflamação no músculo gastrocnêmio esquerdo, mostrou-se efetivo, pois foi possível observar intenso edema no grupo NTD ao longo do estudo (**Figura 3**), apresentando elevada área sobre a curva ( $12,290 \pm 0,617$ ), demonstrando aumento significativo do volume do musculo. Com relação aos grupos tratados com UST, DEX e NAE, foi possível observar que os tratamentos foram capazes de atuar reduzindo significativamente a formação do edema ao longo do tratamento ( $p < 0.001$ ). Ao final do tempo de análise, a área sobre a curva (AUC) da evolução do volume do edema, evidenciou que os grupos tratados com DEX ( $5,946 \pm 0,704$ ) e NAE ( $4,008 \pm 0,460$ )

apresentaram melhor efeito anti-edematogênico ( $p < 0.001$ ), seguido do grupo tratado com UST com  $p < 0.01$  e AUC de  $10,450 \pm 0,387$ .

**Figura 3** - Efeito do tratamento com UST e fonoforese de DEX (0,5 mg/kg) e NAE (0,5 mg/kg) sobre inflamação induzida por veneno de *Bothrops moojeni* administrado intramuscular (0.10 mg/kg) no músculo gastrocnêmio esquerdo de ratos. (A) Expressa a evolução do edema no músculo (mm) em função do tempo (dias). (B) Expressa a área sobre a curva (AUC) obtida da evolução do edema no músculo. Resultados são apresentados como a média  $\pm$  D.P ( $n=5$  animais/grupo). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância One-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey. \*\*\*( $p < 0.001$ ), Resultado estatisticamente significativo versus grupo NTD.



A atividade anti-edematogênica da NAE pode ser atribuída à ação dos terpenos, principalmente os monoterpenos majoritários como o 1,8 cineol, limoneno e cânfora, sobre a redução dos mediadores inflamatórios endógenos liberados em decorrência do veneno e pela otimização da sua absorção favorecida pela aplicação com o ultrassom.

Estudos mostram que os monoterpenos possuem ação anti-inflamatória, ao reduzir a síntese de derivados do ácido araquidônico, tais como: prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrieno B4 (LTB4) (BORGES et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020). No estudo conduzido por Leal et al., (2016), corrobora com nossos achados, onde realizou e aplicação de gel contendo extrato de *Ximenia americana* associado ao ultrassom terapêutico, demonstrou que tanto o ultrassom quando a aplicação fonoforética do extrato, foram capazes de apresentar efeito anti-inflamatório em tendinite em ratos, além disso, infere que o resultado anti-inflamatório é decorrente da somatória da ação dos efeitos do ultrassom e da ação otimizada do medicamento.

Em parte, esses mecanismos podem ser sugestivos do efeito pelo qual a NAE esteja modulando a atividade anti-inflamatória. Por outro lado, a DEX por ser um fármaco corticosteroide, exerce efeito anti-inflamatório por diversos fatores, principalmente pela inibição da PLA2 e consequentemente a redução da produção de mediadores inflamatórios (MARCHIONNI et al., 2006). Além disso, Maia-Filho et al. (2010), relata que a aplicação de anti-inflamatórios corticosteroides apresenta ação otimizada quando associado ao ultrassom. Segundo outros estudos, substâncias com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes podem diminuir significativamente os efeitos edematogênicos produzidos pelo veneno botrópico. (SUNITHA et al., 2015; FÉLIX-SILVA et al., 2017).

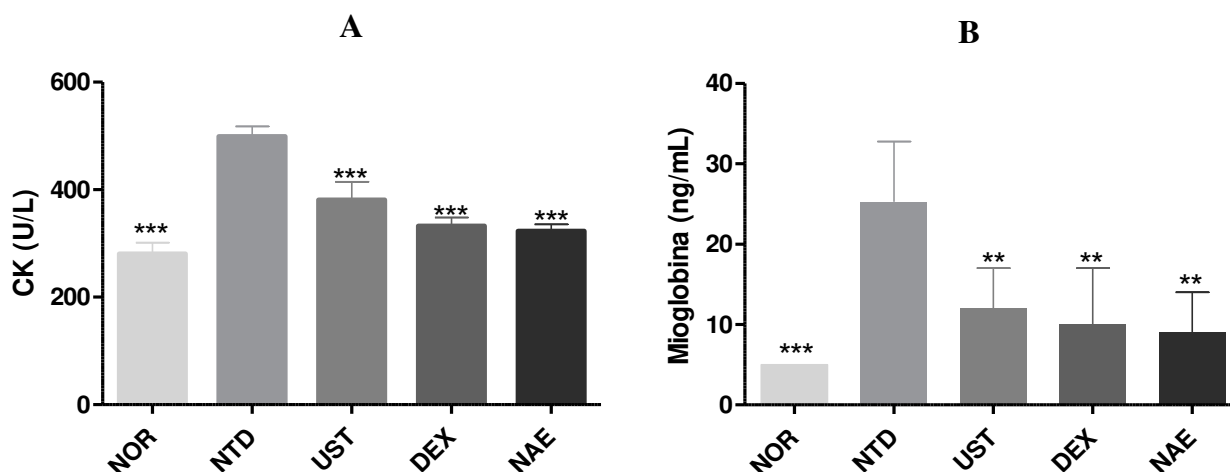
Neste estudo também foi avaliado os níveis séricos da enzima creatino quinase (CK), mioglobina, contagem de células inflamatórias e realizado a histopatologia do tecido muscular, ambos com a finalidade de mensurar a dimensão da inflamação e do dano tecidual ocasionado pela aplicação do VBM no músculo.

Quando avaliado os níveis de CK (**Figura 4.A**), foi observado que o grupo NTD apresentou valores elevados, com níveis séricos de  $499,3 \pm 18,6$  U/L, estatisticamente significativo ( $p < 0.001$ ) quando comparado ao grupo NOR ( $280,6 \pm 21,04$  U/L). Por outro lado, foi possível observar que o grupo tratado com UST apresentou diminuição significativa ( $p < 0.001$ ) nos níveis de CK ( $381,2 \pm 33,1$  U/L) quando comparado ao NTD. Os grupos tratados com fonoforese de DEX e NAE também demonstraram reduções significativas nas concentrações de CK em relação ao grupo NTD, apresentando os menores valores observados, com  $332,6 \pm 15,7$  e  $323,3 \pm 12,4$  U/L, respectivamente.

Os níveis de mioglobina (**Figura 4.B**) apresentaram perfil de alterações similares aos observados em CK, sendo o grupo NTD expressando significativa elevação ( $25,3 \pm 7,5$  ng/ml,  $p < 0.001$ ) em relação ao grupo NOR. Os grupos tratados com UST, fonoforese de DEX e NAE, apresentaram diminuição significativa ( $p < 0.01$ ) dos níveis de mioglobina quando comparados ao grupo NTD.

A CK é uma enzima citoplasmática encontrada no músculo esquelético, quando há o desenvolvimento de lesão muscular, é possível observar sua concentração elevada, alterações exacerbadas refletem necrose muscular avançada (ELY et al., 2000; ALVES et al., 2019). Os níveis de CK e mioglobina elevados no grupo NTD, reforçam o expressivo dano tecidual, pois esse aumento concomitante é forte indício de danos musculares seguido de necrose (MONIZ et al., 2017).

**Figura 4** - Efeito do tratamento com UST e fonoforese de DEX (0,5 mg/kg) e NAE (0,5 mg/kg) sobre os níveis de **(A)** creatino quinase (CK) e **(B)** mioglobina sérica dos ratos com infiltrado inflamatório muscular induzido por aplicação (i.m) de 0.10 mg/kg de veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio. Resultados são apresentados como a média  $\pm$  D.P (n=5 animais). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey. \*\*\*( $p<0.001$ ), Resultado estatisticamente significativo versus grupo NTD.



A mioglobina é uma proteína globular, com baixo peso molecular, encontrada nos músculos esqueléticos e cardíaco. Seu baixo peso molecular permite que ela seja liberada rapidamente na corrente sanguínea após dano muscular (SILVA; MORESCO, 2011). A diminuição dos níveis de mioglobina presente nos grupos UST, DEX e NAE indicam a efetividade destes tratamentos na lesão muscular induzida pelo VBm.

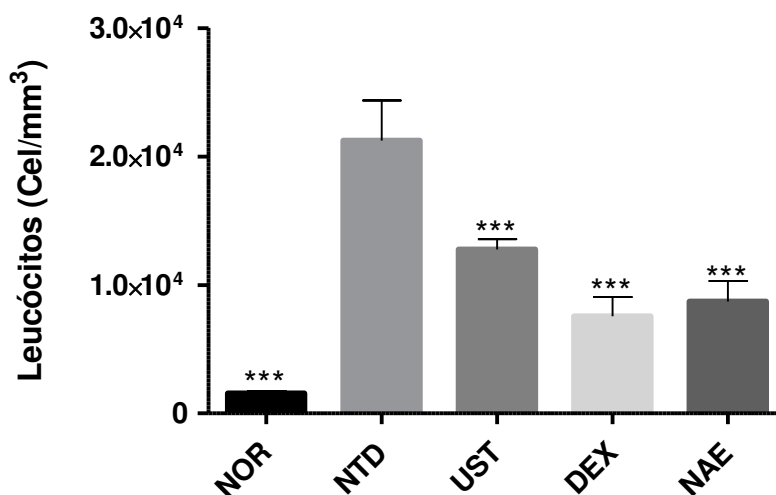
No estudo de Sharp et al. (2020), reporta que os danos musculares levam ao aumento significativo dos níveis de CK e mioglobina. Em trabalho de Lima et al., (2020), avaliando ação anti-inflamatória do nanogel de *Copaifera reticulata* associado a fonoforese em lesão muscular por dano mecânico, reporta em seus resultados que o uso combinado de ultrassom e do nanogel, foram capazes de reduzir significativamente os níveis de CK e contribuiu para a reparação tecidual muscular. Além disso, reforça que agentes anti-inflamatórios pode ser uma alternativa viável e eficaz no tratamento de lesões musculares, em especial associado a princípios ativos anti-inflamatórios nanoestruturados em gel, tal como o que está sendo abordado neste estudo.

No estudo de Carvalho et al., (2020), avaliando o efeito anti-inflamatório da nanoemulsão do óleo de *Cannabis sativa* demonstrou que o tratamento foi capaz de reduzir os níveis CK, além disso, evidenciou diminuição significativa do número células inflamatórias e regeneração muscular.

Estes resultados estão de acordo com os observados neste estudo, pois quando se relaciona os níveis de CK com a contagem de células inflamatórias e com

a histopatologia do músculo, é observado no grupo NTD intenso infiltrado leucocitário com  $2.12 \times 10^{-4}$  Células/mm<sup>3</sup> (**Figura 5**), apresentando valor significativamente elevado ( $p < 0.001$ ) quando comparado ao grupo NOR ( $0.15 \times 10^{-4}$ ). Já nos grupos tratados com UST, DEX e NAE foram observadas reduções extremamente significativas ( $p < 0.001$ ) do infiltrado leucocitário, com valores da contagem de células de  $1.27 \times 10^{-4}$ ,  $0.75 \times 10^{-4}$  e  $0.87 \times 10^{-4}$  Células/mm<sup>3</sup>, respectivamente.

**Figura 5** - Efeito do tratamento com UST e fonoforese de DEX (0,5 mg/kg) e NAE (0,5 mg/kg) sobre infiltrado inflamatório muscular induzido por aplicação (i.m) de 0.10 mg/kg de veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio esquerdo de ratos. Quantificação de leucócitos totais no músculo após o período de tratamento. Resultados são apresentados como a média  $\pm$  D.P (n=5 animais). As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância one-way (ANOVA), seguida do teste de Tukey. \*\*\*( $p < 0.001$ ), Resultado estatisticamente significativo versus grupo NTD.

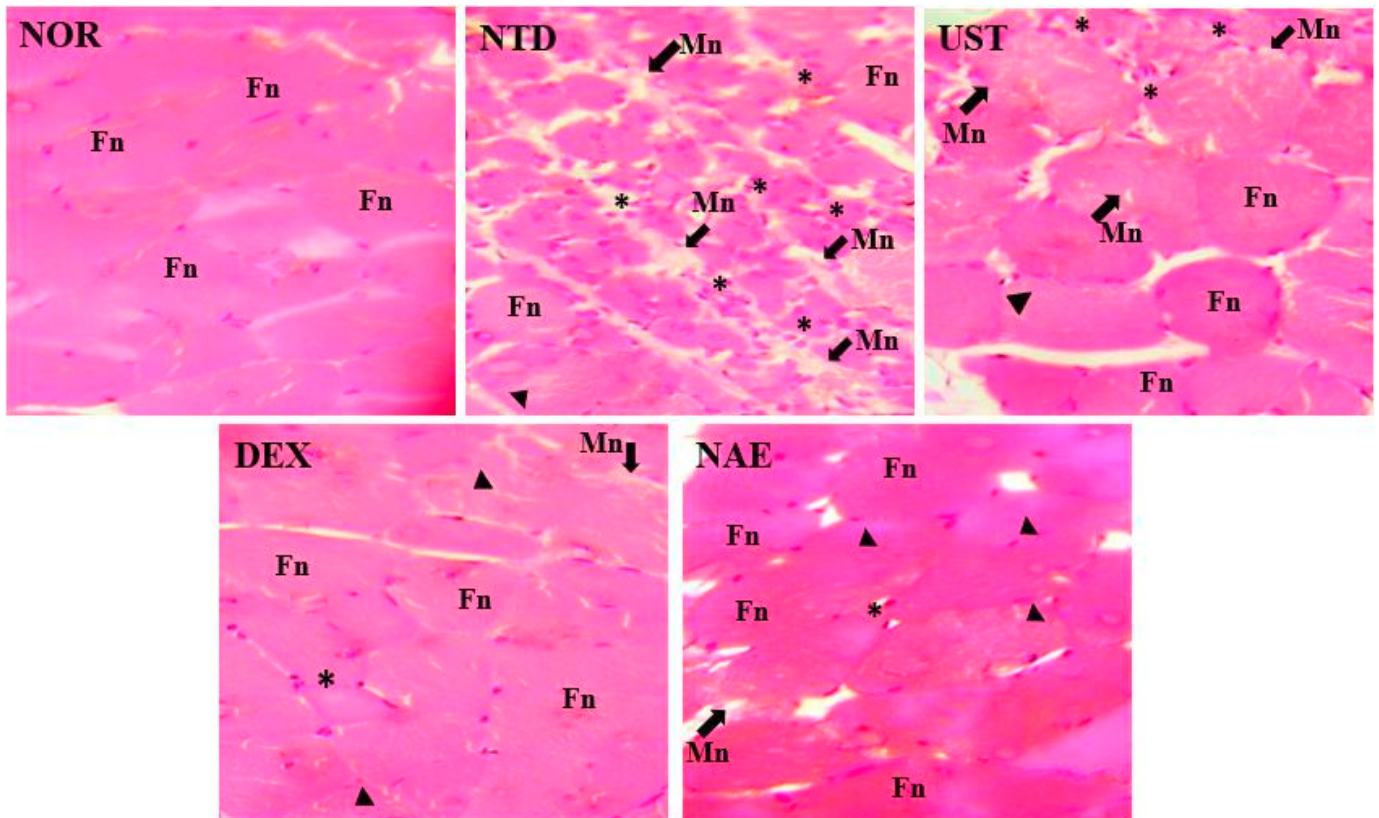


Na histopatologia do músculo gastrocnêmio (**Figura 6**), observa-se que o grupo NTD, evidenciou intensa mionecrose com predomínio de destruição das fibras musculares, além de acentuado infiltrado leucocitário que justificam os altos valores observados de CK. Nos grupos que apresentaram valores reduzidos de CK, como UST, DEX e NAE, observa-se predomínio de fibras musculares normais ou com pouca necrose, sugestivas de regeneração tecidual e discreto infiltrado leucocitário, reforçando o efeito anti-inflamatório nestes tratamentos.

O conjunto de resultados observados para os grupos UST, DEX e NAE, reforçam o efeito anti-inflamatório destes grupos, uma vez que a diminuição de células inflamatórias no local da inoculação do VBm, são fortes indícios de efeito anti-inflamatório. No estudo de David et al., (2022), avaliando a fotobiomodulação após injeção de veneno de *Bothrops alternatus* em músculos de camundongos, relatou que

o efeito anti-inflamatório estava acompanhado de redução de edema, infiltrado celular e mionecrose.

**Figura 6** - Análise histopatológica do efeito do tratamento com UST, DEX (0,5 mg/kg) e NAE (0,5 mg/kg) sobre infiltrado inflamatório muscular induzido por aplicação (i.m) de 0.10 mg/kg de veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio esquerdo de ratos wistar. **Asteriscos:** Infiltrado leucocitário; **Setas pretas:** Mionecrose e destruição da fibra muscular. **Cabeças de setas:** Fibras musculares com pouca necrose.



Camundongos que tiveram veneno de *Bothrops atrox* injetado intramuscularmente, apresentaram diminuição do dano tecidual quando tratados com substância que inibem a PLA2, em partes, o dano tecidual provocado pelo VBm é provocado pela ação da PLA2 presente no veneno (SILVA et al., 2007; STRAUT et al., 2013). Fármacos anti-inflamatórios que atuam diminuindo a formação de mediadores pró-inflamatórios, são eficazes na redução de edema e recrutamento quimiotático de células inflamatórias, contribuindo para que haja diminuição dos danos causados pelo VBm (PICANÇO et al., 2016; CARVALHO et al., 2018).

O processo de reparação tecidual muscular consiste em eventos moleculares e celulares que podem ser acelerados por terapias específicas, como o ultrassom terapêutico e a fonoforese. Em estudo que avaliou os efeitos da fonoforese associado

a nanopartículas de ibuprofeno em lesão muscular de ratos, demonstrou que o tratamento foi capaz de reduzir significativamente os danos teciduais, apresentando regeneração da estrutura muscular e estes resultados estão diretamente ligados à diminuição do estresse oxidativo e redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1, com aumento concomitante dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (HAUPENTHAL et al., 2020).

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível demonstrar a efetividade moduladora sobre o processo inflamatório da lesão muscular induzida pelo VBm, tanto do tratamento com UST quanto com a fonoforese associada ao nanogel de *R. officinalis*, e foi demonstrado a capacidade dos tratamentos em atenuar os danos teciduais e incrementar o seu reparo. As lesões teciduais provocadas pelo veneno são pouco neutralizadas por soros antiofídicos, desse modo, terapias que auxiliam na redução do processo inflamatório, são importantes recursos que minimizam os efeitos locais danosos provenientes dos componentes do veneno botrópico.

A fonoforese desempenha um papel importante quando empregado em combinações terapêuticas com agentes anti-inflamatórios, melhorando a permeação, absorção e aumentando significativamente os efeitos terapêuticos com otimização do tempo de tratamento. Com base no que foi demonstrado, o modelo terapêutico empregado neste estudo pode ser uma alternativa eficaz para tratamentos decorrentes de acidentes ofídicos.

## REFERÊNCIAS

- ALVES BARROS, A.S. et al. Study of the non-clinical healing activities of the extract and gel of *Portulaca pilosa* L. in skin wounds in wistar rats: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 182-190, 2017.
- ALVES, M.M.S.R. et al. Análise crítica da dosagem de creatinofosfoquinase no Pronto-Socorro Central do Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / Critical analysis of the creatine phosphokinase dosage in the Emergency Department of Sao Paulo's Santa Casa de Misericordia Hospital. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 64, n. 1, 2019.
- AGUIAR, W.S. et al. Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. **PLOS ONE**, v. 14, 2019.
- ALCÂNTARA, J.A. et al. Stepping into a dangerous quagmire: Macroecological determinants of *Bothrops* envenomings, Brazilian Amazon. **PLOS ONE**, v. 13, 2018.
- ASSIS, L.M. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 99-109, 2012.
- BORGES, R. S. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 29–45, 2019.
- BORGES, R. S. et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, v. 26, p. 183–195, 2017.
- CARVALHO, J. C. T. et al. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. **Inflammopharmacology**, v. 26, p. 273–284, 2017.
- CARVALHO, H. O. et al. Actions of *Cannabis sativa* L. fixed oil and nano-emulsion on venom-induced inflammation of *Bothrops moojeni* snake in rats. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 123–135, 2021.
- CARVALHO, H. O. et al. Effect of the treatment of *Copaifera duckei* oleoresin (copaiba) in streptozotocin-induced diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 724–731, 2018.
- CAPELETTI, E. et al. Procedência de Serpentes dos Gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (Viperidae) Catalogadas no Serpentário do Jardim Zoológico da Universidade de Caxias do Sul (UCS). **Biota Amazônia**, v. 6, p. 45–51, 2016.
- COSME, M. V. et al. Evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil through the *Allium cepa* Leach bioassay. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 44, e62665, 2022.
- DAVID, A. C. et al. Photobiomodulation therapy on local effects induced by juvenile and adult venoms of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 220, 106941, 2022.

DOS SANTOS HAUPENTHAL, D. P. et al. Effects of phonophoresis with diclofenac linked gold nanoparticles in model of traumatic muscle injury. **Materials Science and Engineering: C**, v. 110, 110681, 2020.

DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of Rosmarinus officinalis essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 189, 2015.

ELY, J. F. et al. Alterações enzimáticas decorrentes de isquemia muscular esquelética em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, p. 142–145, 2000.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Inhibition of local effects induced by Bothrops erythromelas snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of Jatropha gossypifolia. **Toxicon**, v. 125, p. 74–83, 2017.

FERNANDES, C. P. et al. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 23, p. 108–114, 2013.

FONSECA, F. V. et al. Extratos de Curcuma longa L. e Kalanchoe brasiliensis Camb. no tratamento local do envenenamento por Bothrops alternatus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 26–29, 2004.

HAUPENTHAL, D.P.S. et al. Effects of phonophoresis with ibuprofen associated with gold nanoparticles in animal model of traumatic muscle injury. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 143, p. 105120, 2020.

IRACHE, J.M. et al. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 47-71, 2011.

KARTHIK, P.; EZHILARASI, P.N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 1435-1450, 2017.

LIMA, T.C.P. et al. Desenvolvimento de nanogel de Copaifera reticulata sobre a lesão muscular em ratos usando fonoforese. **Saúde e Pesquisa**, v. 13, p. 181-192, 2020.

LEAL, S.S. et al. Eficácia da fonoforese com Ximenia americana L. na inflamação de tendão de ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 05, 2016.

MAIA-FILHO, A.L.M. et al. Comparative Study of the Topical Application of Aloe Vera Gel, Therapeutic Ultrasound and Phonophoresis on the Tissue Repair in Collagenase-Induced Rat Tendinitis. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 36, p. 1682-1690, 2010.

MARCHIONNI, A.M.T.; PAGNONCELLI, R.M.; REIS, S.R.A. Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 51, p. 22-29, 2006.

MARTINS, M. et al. Ação anti-inflamatória da fração lipídica do Ovis aries associado ao ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos (Rattus norvegicus). **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 15, n. 4, 2011.

MENALDO, DL et al. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from *Bothrops atrox* venom. **Molecular Immunology**, v. 85, p. 238-247, 2017.

MIKULCOVÁ, V et al. Formulation, Characterization and Properties of Hemp Seed Oil and Its Emulsions. **Molecules**, v. 22, p. 700, 2017.

MONIZ, MS et al. Rhabdomyolysis as a manifestation of a metabolic disease: a case report. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, 2017.

OLSSON, DC et al. Therapeutic ultrasound in the tissue healing. **Clínica e Cirurgia Cienc. Rural**, v. 38, n. 4, 2008.

OSTERTAG, F et al. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, p. 95-102, 2012.

PATRA, JK et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, 2018.

PICANÇO, L. C. S. et al. Pharmacological activity of *Costus spicatus* in experimental *Bothrops atrox* envenomation. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 2103-2110, 2016.

PICOLO, G. et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1221-1228, 2002.

RODRIGUES, A. P. S. et al. The effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its nanoemulsion on dyslipidemic Wistar rats. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 18, p. 126-135, 2020.

SALVADOR, G. H. M. et al. Biochemical, pharmacological and structural characterization of BmooMP-I, a new P-I metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Biochimie**, v. 179, p. 54-64, 2020.

SATYAL, P. et al. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. **Foods**, v. 6, p. 20, 2017.

SHARP, M. et al. Phytoplankton Supplementation Lowers Muscle Damage and Sustains Performance across Repeated Exercise Bouts in Humans and Improves Antioxidant Capacity in a Mechanistic Animal. **Nutrients**, v. 12, p. 1990, 2020.

SILVA, J. O. et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, p. 283-291, 2007.

SOUSA, E. A. et al. Effects of a low-level semiconductor gallium arsenide laser on local pathological alterations induced by *Bothrops moojeni* snake venom. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, p. 1895-1902, 2013.

SILVA, S. H.; MORESCO, R. N. Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda. **Scientia Medica**, v. 21, p. 132-142, 2011.

STRAUCH, M. A. et al. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 50-58, 2013.

SUNITHA, K. et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. **Toxicon**, v. 98, p. 89-97, 2015.

TAKAYAMA, C. et al. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 677-681, 2016.

TAKAKI, I. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 741-746, 2008.

## ANEXO 1

### PARECER COMITÊ DE ÉTICA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP**

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 03 de novembro de 2022, o parecer referente ao protocolo no. **020/2022** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado **"VALIDAÇÃO QUÍMICA-FARMACOLÓGICA COMO CANABINOIDE SÍMILE DO ÓLEO PADRONIZADO DE *Copaifera sp.* (COPAÍBA) E SUAS PREPARAÇÕES"** coordenado por **Helison de Oliveira Carvalho**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

### CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting on 03 November 2022, the final decision about the Protocol **020/2022** and certify that the research project entitled **"VALIDAÇÃO QUÍMICA-FARMACOLÓGICA COMO CANABINOIDE SÍMILE DO ÓLEO PADRONIZADO DE *Copaifera sp.* (COPAÍBA) E SUAS PREPARAÇÕES"** coordinated by **Helison de Oliveira Carvalho**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 03 de novembro de 2022


Documento assinado digitalmente  
 JOSE CARLOS TAVARES CARVALHO  
Data: 03/11/2022 14:54:08-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

**Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho**  
*Presidente CEUA-UNIFAP*  
*Port. No. 1733/2014*

## ANEXO 2

## COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

23/04/2023, 13:28

E-mail de Universidade Federal do Amapá - IPHM-D-23-00363 - Submission Confirmation



JOSE Carlos Tavares CARVALHO &lt;farmacos@unifap.br&gt;

**IPHM-D-23-00363 - Submission Confirmation**

1 mensagem

**Inflammopharmacology (IPHM)** <em@editorialmanager.com>

23 de abril de 2023 às 13:02

Responder a: "Inflammopharmacology (IPHM)" &lt;sharmila.prathaban@springer.com&gt;

Para: José Carlos Tavares Carvalho &lt;farmacos@unifap.br&gt;

Dear Professor Carvalho,

Thank you for submitting your manuscript, Rosmarinus officinalis essential oil nanogel associated with phonophoresis: modulating effect on muscle damage induced by Bothrops moojeni snake venom, to Inflammopharmacology.

The submission id is: IPHM-D-23-00363

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's Editorial Manager site.

Your username is: jctcarvalho

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at

<https://www.editorialmanager.com/iphm/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
Inflammopharmacology

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/iphm/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

## ANEXO 3

## ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA INFLAMMOPHARMACOLOGY

## Inflammopharmacology

## Rosmarinus officinalis essential oil nanogel associated with phonophoresis: modulating effect on muscle damage induced by Bothrops moojeni snake venom

--Manuscript Draft--

|                                                      |                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Manuscript Number:</b>                            |                                                                                                                                                        |
| <b>Full Title:</b>                                   | Rosmarinus officinalis essential oil nanogel associated with phonophoresis: modulating effect on muscle damage induced by Bothrops moojeni snake venom |
| <b>Article Type:</b>                                 | Original Article                                                                                                                                       |
| <b>Keywords:</b>                                     | Rosmarinus officinalis; snake venom; phonophoresis; anti-inflammatory                                                                                  |
| <b>Corresponding Author:</b>                         | José Carlos Tavares Carvalho, PhD<br>Federal University of Amapá: Universidade Federal do Amapá<br>Macapá, Amapá BRAZIL                                |
| <b>Corresponding Author Secondary Information:</b>   |                                                                                                                                                        |
| <b>Corresponding Author's Institution:</b>           | Federal University of Amapá: Universidade Federal do Amapá                                                                                             |
| <b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b> |                                                                                                                                                        |
| <b>First Author:</b>                                 | Danna Emanuelle Santos Gonçalves, Master Student                                                                                                       |
| <b>First Author Secondary Information:</b>           |                                                                                                                                                        |
| <b>Order of Authors:</b>                             | Danna Emanuelle Santos Gonçalves, Master Student                                                                                                       |
|                                                      | Joelma Aparecida Araújo, Student                                                                                                                       |
|                                                      | Helison de Oliveira Carvalho, PhD                                                                                                                      |
|                                                      | Alicia de Melo Santos, Student                                                                                                                         |
|                                                      | Karyny Roberta Tavares Picanço, Master Student                                                                                                         |
|                                                      | Abrahão Victor Tavares de Lima Teixeira dos Santos, PhD Student                                                                                        |
|                                                      | ALINE LOPES DO NASCIMENTO, Doctor Student                                                                                                              |
|                                                      | José Carlos Tavares Carvalho, PhD                                                                                                                      |

***Rosmarinus officinalis* essential oil nanogel associated with phonophoresis:  
modulating effect on muscle damage induced by *Bothrops moojeni* snake venom.**

Danna Emanuelle Santos Gonçalves<sup>1,3</sup>, Joelma Aparecida Araújo<sup>3</sup>, Helison de Oliveira Carvalho<sup>1</sup>, Alicia de Melo Santos, Karyny Roberta Tavares Picanço<sup>1</sup>, Abrahão Victor T. L. T. dos Santos<sup>1,2</sup>, Aline Lopes do Nascimento<sup>1,2</sup>, José Carlos T. Carvalho<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Inovação Farmaceutica, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá.

<sup>3</sup>Curso de Fisioterapia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá.

\*Corresponding author: [farmacos@unifap.br](mailto:farmacos@unifap.br)

### **Abstract**

The venom of *B. moojeni* (VBm) contains toxins that induce local toxic effects, triggering a severe inflammatory process, pain, hemorrhage, edema, and myonecrosis. Phonophoresis is a technique that uses therapeutic ultrasound (TUS) associated with an agent with pharmacological properties, optimizing drug delivery systems in nanoformulations. *Rosmarinus officinalis* is a plant with anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant effects. Therefore, this study aimed to evaluate the modulatory effect of the application of *R. officinalis* nanogel associated with phonophoresis on VBm-induced muscle injury in Wistar rats. The chemical results demonstrated predominantly Limonene (5.08%), 1,8 Cineole (35.28%), and Camphor (46.92%) compounds. The nanoemulsion (NAE) exhibited stability with a mean drop diameter ranging from  $213 \pm 2.1$  (1st day) to  $153.9 \pm 2.7$  nm (30th day), with a polydispersity index ranging from  $0.10 \pm 0.001$  to  $0.13 \pm 0.01$ . The nanogel was prepared from NAE in a carbopol hydrogel. A dose of 0.10 mg/kg of VBm was applied to induce inflammation in the gastrocnemius muscle. The evolution of edema volume showed that the groups treated with TUS ( $p < 0.01$ ), phonophoresis with Dexamethasone ( $p < 0.001$ ), and nanoemulsion ( $p < 0.001$ ) presented a significant anti-edematogenic effect. Moreover, they were able to reduce CK and myoglobin levels and the recruitment of inflammatory cells to the injury site. Histopathological findings reinforced the anti-inflammatory effect with decreased muscle damage and myonecrosis. Therefore, it is suggested that the modulatory effectiveness on the inflammatory process and muscle injury induced by VBm was demonstrated, both with TUS treatment and with phonophoresis associated with *R. officinalis* nanogel. Furthermore, the treatments were shown to attenuate tissue damage and enhance repair.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*, snake venom, phonophoresis, anti-inflammatory.

## Introduction

Annually, over 2.5 million ophidian accidents occur worldwide, which represents a serious public health issue in various regions, particularly in tropical and subtropical countries in the Amazonian region, such as Brazil, where snakes of the genus *Bothrops* are responsible for 87% of these accidents (Capeletti et al., 2016; Feliz-silva et al., 2017). The most affected victims are residents of endemic areas, usually rural workers, hunters, and individuals who enter closed forest areas and farms without appropriate protective clothing (Salvador et al., 2020).

The snakes of the genus *Bothrops* belong to the family *Viperidae* and are the most widely distributed species in Latin America. *Bothrops moojeni* is a snake known in Brazil by several names, such as "caçaca", "jararacão", "jararaca" and "comboia", and is often found in regions with hot and dry climates (Alcântara et al., 2018). The venom of *B. moojeni* (VBm) contains a variety of toxins (enzymes), including phospholipase A2 (PLA2), metalloproteinases (SVMPs), serine-proteinases, hyaluronidases, among others that can produce biological actions (Menaldo et al., 2017; Aguiar et al., 2019).

The VBm presents local toxic effects that include a pronounced inflammatory response, pain, hemorrhage, edema, and myonecrosis at the sting site, which depending on the intensity, can lead to necrosis of deep tissues, systemic damage, and lethality (Carvalho et al., 2018). The inflammatory response induced by the VBm is primarily characterized by intense edema, produced by factors such as the direct action of venom components on the microvasculature, increasing the permeability of capillaries, recruitment of inflammatory cells, and exacerbation of the production of endogenous mediators such as histamine, prostaglandins, kinins, and other pro-inflammatory agents (Sunitha et al., 2015; Picanço et al., 2016).

In ophidian accidents, the inflammatory response mechanism is not entirely neutralized after antiothropic serum administration, resulting in significant tissue damage at the site of venom inoculation, especially when the serum is administered late. Therefore, supplementation with anti-inflammatory drugs and other therapies is required to reduce the venom's local effects (Picolo et al., 2002; Fonseca et al., 2004).

Therapeutic ultrasound (TUS) is a non-invasive resource commonly employed in physiotherapeutic routines and stands out as a valuable treatment option for tissue repair (Martins et al., 2011). TUS employs ultrasonic waves via a transducer to generate longitudinal sound energy that can penetrate biological tissues and induce cellular changes through mechanical and thermal effects. These effects increase cellular metabolism, blood flow, oxygen supply, permeability, and local temperature (Olsson et al., 2008).

Phonophoresis is a technique that uses TUS in association with a pharmacologically active agent, which enables drug permeation and facilitates transcutaneous passage. The use of phonophoresis in topical applications increases cell membrane permeability, resulting in decreased cutaneous resistance, and increases blood flow, allowing for greater penetration and absorption of pharmacological agents (Lima et al., 2020). Therapeutic advances have been proposed that involve combining phonophoresis with nanoformulations to enhance therapeutic effects and improve drug absorption and administration to target tissues (Dos Santos Haupenthal et al., 2020).

Therapeutic effects can be optimized when using drug delivery systems in nanoformulations. Nanoformulations are pharmaceutical forms that transport drugs at nanometric scales, usually less than 300 nm. The use of these formulations can improve their therapeutic index and reduce toxic properties, enhancing pharmacokinetics, biodistribution, and efficacy (Assis et al., 2012; Patra et al., 2018). Nanoemulsions are a class of nanoformulations containing dispersed systems between two immiscible liquids, containing an aqueous and an oily phase stabilized by a surfactant (Ostertag et al., 2012). They have advantages such as increased stability, greater penetration power through biological membranes, and improved bioavailability and solubility, which increases therapeutic potential (Irache et al., 2011).

*Rosmarinus officinalis* L. is a perennial plant popularly known as "rosemary", originating from Mediterranean regions and belonging to the *Lamiaceae* family. *R. officinalis* is cultivated worldwide due to its nutritional and pharmacological properties (Rodrigues et al., 2020; Cosme et al., 2022). Essential oil is extracted from *R. officinalis* (EORO), which has a chemical composition rich in monoterpenes such as 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene, limonene, and camphor (Takayama et al., 2016). Previous studies have demonstrated the significant anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant effects of EORO and its nanoemulsion in experimental models (Takaki et al., 2008; Borges et al., 2017; Borges et al., 2019).

Due to the significant anti-inflammatory activity attributed to EORO and its nanoemulsion, as well as the need for effective therapeutic approaches that minimize the inflammatory effects and tissue damage caused by ophidian accidents, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory effect of *R. officinalis* nanogel application associated with phonophoresis on muscle injury induced by venom from the snake *Bothrops moojeni* in Wistar rats.

## **Material and Methods**

### **Obtaining the essential oil of *R. officinalis* (EORO)**

The EORO (Lot 056757-LC02062016DA) was acquired from the company Florien (São Paulo, Brazil). According to the company's quality certificate, the EORO was extracted from the leaves of the *R. officinalis* species.

### **Chemical analysis of the EORO by GC-MS**

The analysis of the chemical composition of the EORO was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), where 100  $\mu$ L of EORO was dissolved in 2 mL of CG-MS grade Hexane. The analysis was carried out using a Shimadzu/GC-2010 instrument, Shimadzu/AOC-5000 auto-injector, and mass detector (Shimadzu MS2010 Plus) with electronic impact (70 eV), equipped with a DB-5MS fused silica column (Agilent Advanced J&W; 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m). The following parameters were used: split ratio 1:30; Helium as the carrier gas (65 kPa); injection volume of 1.0  $\mu$ L; injector temperature at 250 °C; detector temperature at 250 °C; initial column temperature at 60 °C for 1 min; heating rate of 3 °C min<sup>-1</sup> to 290 °C. The total analysis time was 41.30 minutes. Compound identification was performed by comparing the fragmentation pattern of the compounds with the mass spectrum library contained in the NIST 5.0 equipment (Rodrigues et al., 2020).

### **Obtaining, characterizing and stability of the nanoemulsion (NAE)**

The nanoemulsion (NAE) was prepared using a low-energy technique, following the methodology described by Borges et al., (2017). For a final mass of 20 g, 90% water, 5% EORO, and 5% Tween 20 were used. Initially, a phase was prepared by adding EORO and Tween 20, and the mixture was stirred using a magnetic stirrer (750 rpm) for 30 min. Then, the aqueous phase was added at a flow rate of 5.0 mL/min with constant stirring for 60 min. The stability of the nanoemulsion was evaluated on the 1st, 7th, 14th, and 30th days after preparation, using macroscopic analysis of color, visual appearance, phase separation, and sedimentation. The particle size and polydispersity index were evaluated using a Zetasizer 5000 instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK). The NAE was diluted using ultrapure Milli-Q water (1:25), and the measurements were performed in triplicate, with values expressed as mean and standard deviation.

### **Incorporation of NAE in Carbomer Gel**

Carbomer gel (Carbopol®) was prepared using phase A: Methylparaben (0.3%), Propylparaben (0.2%), Propylene Glycol (4%); phase B: Carbopol® (2%), Distilled Water (93.5%). Components of phases A and B were heated and then slowly mixed with a mechanical stirrer until a gel-like appearance and characteristic was obtained. The pH was adjusted to 6.5 using triethanolamine. 10 g (20%) of NAE was weighed and added to 40 g (80%) of Carbopol® gel, which was then stirred on a magnetic stirrer (750 rpm) for 120 minutes, resulting in a final formulation of 50 g. The gel/NAE ratio was determined by macroscopic characteristics of the nanogel formed, phase separation, appearance, color, odor, topical spreadability, sliding and coupling of the ultrasound transducer at room temperature (Alves Barros et al., 2017; Lima et al., 2020).

#### **Ethical considerations, animals used, and obtaining *Bothrops moojeni* venom (VBm)**

The present study was submitted to the Ethics Committee for Animal Use of the Federal University of Amapá, CEUA-UNIFAP, and was approved on November 3, 2022, under Protocol No. 020/2022.

In this study, male Wistar rats aged 21 days from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation in Laboratory Animal Science (CEMIB) at the University of Campinas (UNICAMP) were used. During the study, the animals were housed in polyethylene boxes with stainless steel bars measuring 60 cm × 50 cm × 22 cm. They were kept in a climate-controlled environment for a period of acclimatization, grouped in groups of five animals per box, maintained under controlled temperature conditions ( $21 \pm ^\circ\text{C}$ ), with free access to food and drinking water, with a 12-hour light/dark cycle and bedding changes, in the Drug Research Laboratory of the Federal University of Amapá.

The VBm used in this study was lyophilized and obtained from the Serpentarium of the University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil. The venom was dissolved in a vehicle solution and immediately injected into the animals during the assay.

#### **Experimental design and VBm-induced muscle injury in the gastrocnemius muscle of rats**

The gastrocnemius muscle injury was performed as previously described by (Carvalho et al., 2021). 0.10 mg/kg of the *B. Moojeni* venom (VBm) was diluted in 100 µl of sterile saline solution and then administered into the left muscle of the rats. After the venom application, the animals were treated daily for 6 days with therapeutic ultrasound (TUS) or phonophoresis, as described below.

The animals were divided into five experimental groups (n=5), with the group of normal animals (NOR) being the only group that did not receive treatment and had no injury induced by VBm; Untreated control group (UTD); Therapeutic ultrasound group (TUS); Group treated with dexamethasone phonophoresis at a dose of 0.5 mg/kg in gel (DEX); Group treated with NAE nanogel phonophoresis at a dose of 0.5 mg/kg (NAE). The therapeutic ultrasound and phonophoresis parameters were as follows: frequency of 1 MHz, pulsed at 20%, intensity of 0.6 W/cm<sup>2</sup>, and effective radiation area (ERA) of 3 cm<sup>2</sup> (Dos Santos Haupenthal et al., 2020). The application was directly on the central region of the gastrocnemius muscle with slow, circular, and uniform movements, using the Sonopulse Special Ibramed equipment (Imbramed Company, Brazil).

### **Evaluation of CK and myoglobin levels in blood collected from the animals**

The animals were anesthetized, and 1.0 ml of blood was collected from the retro-orbital plexus. The collected blood was centrifuged for 10 minutes at 5,000 rpm, and the serum levels of total creatine kinase (CK) were quantified using the CK-NAC Liquiform kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil). The samples were analyzed using a UV-VIS spectrophotometer model UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The analysis of myoglobin levels was performed using the instructions for the APOTI<sup>TM</sup> reagent kits (Acro Biotech Inc. California, USA).

### **Euthanasia, leukocyte quantification, and histopathological evaluation of VBm-induced injury in the gastrocnemius muscle**

The animals were euthanized with thiopental overdose, and the gastrocnemius muscle was removed and weighed on an analytical balance (Bel, Model: M214AIH, São Paulo, Brazil). A portion of the muscle was separated for histopathology, and 400 mg was ground with a scalpel blade and homogenized in 2 mL of PBS. The suspension was incubated for 30 min and then filtered with gauze. A fraction of the filtered solution was diluted in Turk's solution (1:20) for total leukocyte counting in a Neubauer chamber.

Samples of the gastrocnemius muscle for histopathological analysis were prepared according to the technique described by Carvalho et al., (2018). The samples were dehydrated successively in graded alcohols of 70%, 80%, 90%, and 100%, clarified with xylene, and embedded in paraffin at 60 °C. Tissue samples were sectioned with a thickness of 5 µm using a semi-automatic rotary microtome (CUT 5062 SLEE model), and the sections were stained by the Hematoxylin-Eosin (H/E) method. The slides were analyzed using an Olympus optical microscope (Model: CX31trinocular) with a 40X objective, where inflammatory infiltrate foci

in the muscle, intact muscle fibers, and those with myonecrosis were observed (Sousa et al., 2013).

### Statistical analysis of the results

Values are presented as mean and standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test was performed. Results that showed differences of  $P < 0.05$  were considered statistically significant between groups.

### Results and discussion

Regarding the chemical analysis of EORO by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), it was possible to perform peak integration and identification by comparing the fragmentation spectra with the GC-MS library, which allowed the identification of 14 terpenic compounds present in EORO representing 93.82% of the compounds, predominantly Limonene, with a percentage of 5.08%, 1,8-Cineole with 35.28%, and Camphor with 46.92% (Fig. 1; Table 1).

These chemical results corroborate those found by other authors, who report high concentrations of Camphor and 1,8-Cineole in EORO, with values ranging from 15% to 45% (Fernandes et al., 2013; Borges et al., 2017). Studies conducted by Duarte et al., (2015) and Satyal et al., (2017) on EORO highlighted the main constituents as the monoterpenes camphor, 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene, and limonene.

From EORO, a nanoemulsion (NAE) was obtained from the essential oil of *R. officinalis*, and its stability was evaluated for 30 days. During the period, the NAE did not show any changes, such as phase separation or color changes (white/opaque). In addition, it was observed that the average droplet diameter varied from  $213 \pm 2.1$  (1st day) to  $153.9 \pm 2.7$  nm (30th day), with a polydispersity index ranging from  $0.10 \pm 0.001$  to  $0.13 \pm 0.01$  during the same study period (Fig. 2).

The results obtained in this study are similar to what has been found in other works, where it is described that the long-term stability of nanoemulsions depends, in part, on the size of the formed droplets, as nanoemulsions with relatively large droplets (above 590 nm) easily lose stability. On the other hand, nanoemulsions with smaller droplets remain stable for long periods without phase separation, coalescence, aggregation, or creaming (Mikulcova et al., 2017; Karthik et al., 2017). Studies conducted by Fernandes et al (2013) and Duarte et al (2015) corroborate our results, as they obtained stable nanoemulsions of *R.*

*officinalis* essential oil with a mean droplet diameter ranging from 97.12 to 237.8 nm and low polydispersity.

After evaluating the stability of the nanoemulsion (NAE), it was incorporated into a gel. Due to the liquid nature of the NAE, which makes it difficult to apply topically with phonophoresis, it was combined with a hydrogel to increase its viscosity and enable topical application via the pathway associated with ultrasonic waves. The final concentration of the formulation resulted in 20% NAE in Carbopol® gel. The formulation did not show phase separation or any changes indicating loss of stability during the tests and facilitated the sliding of the ultrasound transducer at the application site.

The venom of snakes from the genus *Bothrops* is characterized by causing an accelerated inflammatory process in the inoculation site, resulting initially in intense edema. This inflammatory response is caused by various factors, including the direct action of venom components on the microvasculature, increased permeability, and exacerbation of the effects of endogenous mediators such as histamine, prostaglandins, and other pro-inflammatory substances (Sunitha et al., 2015).

In this study, the application of *B. moojeni* venom at a dose of 0.10 mg/kg to induce inflammation in the left gastrocnemius muscle was found to be effective, as intense edema was observed in the UTD group throughout the study (Fig. 3), with a high area under the curve ( $12.290 \pm 0.617$ ), indicating a significant increase in muscle volume. Regarding the groups treated with TUS, DEX, and NAE, it was possible to observe that the treatments significantly reduced edema formation throughout the treatment ( $p < 0.001$ ). At the end of the analysis time, the area under the curve (AUC) of the edema volume evolution showed that the groups treated with DEX ( $5.946 \pm 0.704$ ) and NAE ( $4.008 \pm 0.460$ ) had a better anti-edematogenic effect ( $p < 0.001$ ), followed by the TUS-treated group with  $p < 0.01$  and an AUC of  $10.450 \pm 0.387$ .

The anti-edematogenic activity of NAE can be attributed to the action of terpenes, mainly the predominant monoterpenes such as 1,8 cineole, limonene, and camphor, on reducing the venom-mediated release of endogenous inflammatory mediators and by optimizing their absorption facilitated by ultrasound application.

Studies have shown that monoterpenes have anti-inflammatory action by reducing the synthesis of arachidonic acid derivatives, such as prostaglandin E2 (PGE2), thromboxane A2 (TXA2), prostacyclin (PGI2), and leukotriene B4 (LTB4) (Borges et al., 2017; Rodrigues et al., 2020). A study conducted by Leal et al. (2016) corroborates our findings. In the study, a gel containing *Ximenia americana* extract associated with therapeutic ultrasound was applied, and both ultrasound and phonophoresis application of the extract were able to present an anti-

inflammatory effect in rat tendinitis. Moreover, it infers that the anti-inflammatory result is due to the sum of the effects of ultrasound and optimized drug action.

These mechanisms provide insight into how NAE modulates anti-inflammatory activity. DEX, a corticosteroid drug, on the other hand, has anti-inflammatory effects through a variety of mechanisms, most notably by inhibiting PLA2 and thus reducing the production of inflammatory mediators (Marchionni et al., 2006). In addition, Maia-Filho et al. (2010) reported that the application of corticosteroid anti-inflammatory drugs has an optimized action when associated with ultrasound. According to other studies, substances with anti-inflammatory and antioxidant properties can significantly reduce the edematogenic effects of the VBm (Sunitha et al., 2015; Félix-Silva et al., 2017).

In this study, serum levels of the enzyme creatine kinase (CK), myoglobin, inflammatory cell count, and histopathology of the muscle tissue were also evaluated to measure the extent of inflammation and tissue damage caused by VBm application in the muscle.

When CK levels were evaluated (Fig. 4.A), it was observed that the UTD group showed elevated values, with serum levels of  $499.3 \pm 18.6$  U/L, which was statistically significant ( $p < 0.001$ ) when compared to the NOR group ( $280.6 \pm 21.04$  U/L). On the other hand, it was possible to observe that the group treated with TUS showed a significant decrease ( $p < 0.001$ ) in CK levels ( $381.2 \pm 33.1$  U/L) when compared to UTD. The groups treated with DEX and NAE phonophoresis also demonstrated significant reductions in CK concentrations compared to the UTD group, presenting the lowest values observed, with  $332.6 \pm 15.7$  and  $323.3 \pm 12.4$  U/L, respectively.

The levels of myoglobin (Fig. 4.B) showed a profile of alterations similar to those observed in CK, with the UTD group expressing a significant elevation ( $25.3 \pm 7.5$  ng/ml,  $p < 0.001$ ) compared to the NOR group. The groups treated with TUS, DEX phonophoresis, and NAE also showed a significant decrease ( $p < 0.01$ ) in myoglobin levels compared to the UTD group.

CK is a cytoplasmic enzyme found in skeletal muscle. Muscle injury increases concentration, and excessive changes reflect advanced muscle necrosis (Ely et al., 2000; Alves et al., 2019). The elevated levels of CK and myoglobin in the UTD group reinforce the significant tissue damage, as this concurrent increase strongly indicates muscle damage followed by necrosis (Moniz et al., 2017).

Myoglobin is a globular protein with low molecular weight found in skeletal and cardiac muscles. Its low molecular weight allows it to be rapidly released into the bloodstream after

muscle damage (Silva; Moresco, 2011). The decrease in myoglobin levels observed in the TUS, DEX, and NAE groups indicates the effectiveness of these treatments in VBM-induced muscle injury.

In the study by Sharp et al (2020), it was reported that muscular damage leads to a significant increase in CK and myoglobin levels. Lima et al., (2020) evaluated the anti-inflammatory action of *Copaifera reticulata* nanogel associated with phonophoresis in muscle injury caused by mechanical damage. Their findings revealed that the combined use of ultrasound and nanogel was able to significantly reduce CK levels and contribute to muscle tissue repair. Additionally, it reinforces that anti-inflammatory agents may be a viable and effective alternative in the treatment of muscle injuries, especially when associated with nanostructured anti-inflammatory active principles in gel form, as is being addressed in this study.

In the study by Carvalho et al., (2020), which evaluated the anti-inflammatory effect of *Cannabis sativa* oil nanoemulsion, it was demonstrated that the treatment reduced CK levels and showed a significant decrease in the number of inflammatory cells and muscle regeneration.

These results are consistent with those observed in this study, as when the levels of CK are related to the count of inflammatory cells and the histopathology of the muscle, a significant leukocyte infiltration is observed in the UTD group, with  $2.12 \times 10^{-4}$  Cells/mm<sup>3</sup> (Fig. 5), presenting a significantly higher value ( $p < 0.001$ ) when compared to the NOR group ( $0.15 \times 10^{-4}$ ). In the groups treated with TUS, DEX, and NAE, extremely significant reductions ( $p < 0.001$ ) of the leukocyte infiltration were observed, with cell count values of  $1.27 \times 10^{-4}$ ,  $0.75 \times 10^{-4}$ , and  $0.87 \times 10^{-4}$  Cells/mm<sup>3</sup>, respectively.

In the histopathology of the gastrocnemius muscle (Fig. 6), it is observed that the UTD group showed intense myonecrosis with a predominance of muscle fiber destruction, in addition to a marked leukocyte infiltration that justifies the high CK values observed. In the groups that showed reduced CK values, such as TUS, DEX, and NAE, normal muscle fibers or with little necrosis are predominant, suggestive of tissue regeneration and slight leukocyte infiltration, reinforcing the anti-inflammatory effect of these treatments.

The set of results observed for the TUS, DEX, and NAE groups reinforces the anti-inflammatory effect of these groups, as the decrease in inflammatory cells at the site of VBM inoculation strongly indicates an anti-inflammatory effect. In the study by David et al., (2022), which evaluated photobiomodulation after injection of *Bothrops alternatus* venom into mouse muscles, it was reported that the anti-inflammatory effect was accompanied by a reduction in edema, cellular infiltration, and myonecrosis.

Mice that received an intramuscular injection of *Bothrops atrox* venom showed decreased tissue damage when treated with substances that inhibit PLA2. In part, the tissue damage caused by the VBm is due to the action of PLA2 present in the venom (Silva et al., 2007; Straut et al., 2013). Anti-inflammatory drugs that inhibit the formation of pro-inflammatory mediators effectively reduce edema and chemotactic recruitment of inflammatory cells, thereby contributing to the reduction of VBm damage (Picanço et al., 2016; Carvalho et al., 2018).

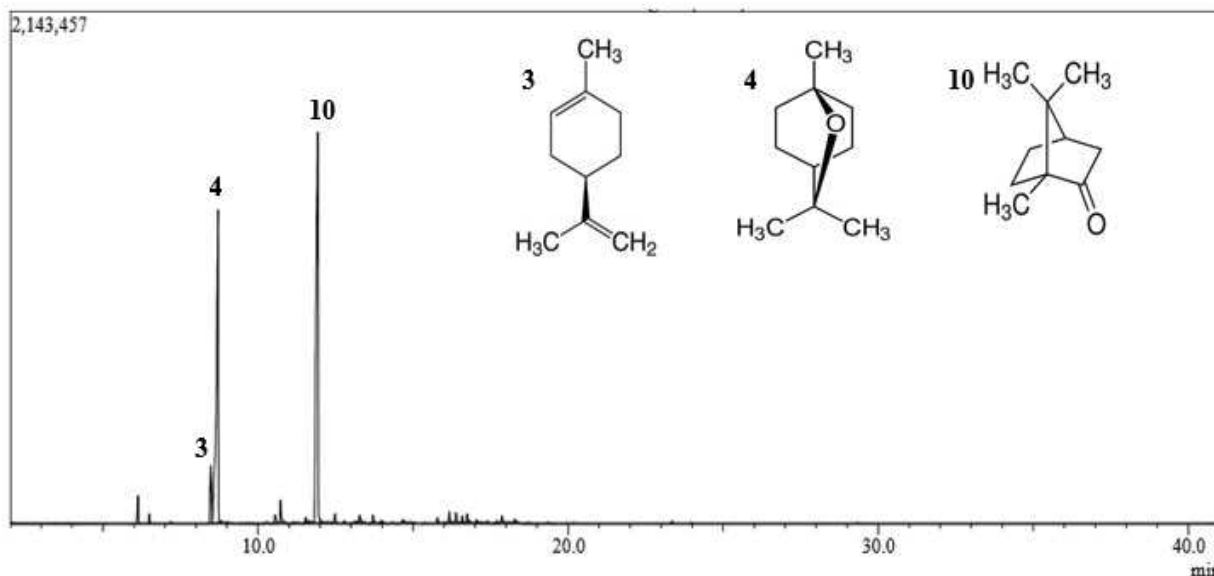
The muscle tissue repair process consists of molecular and cellular events that can be accelerated by specific therapies such as therapeutic ultrasound and phonophoresis. In a study that evaluated the effects of phonophoresis associated with ibuprofen nanoparticles on muscle injury in rats, the treatment significantly reduced tissue damage, presenting regeneration of the muscle structure. These results are directly linked to the reduction of oxidative stress and the reduction in TNF- $\alpha$  and IL-1 levels, with a concomitant increase in anti-inflammatory cytokines levels (Haupenthal et al., 2020).

## Conclusion

Based on the obtained results, it was possible to demonstrate the modulatory effectiveness on the inflammatory process and muscle injury induced by VBm, both from TUS treatment and phonophoresis associated with *R. officinalis* nanogel, demonstrating the ability of the treatments to attenuate tissue damage and increase repair. Snake antivenoms poorly neutralize tissue lesions caused by the venom. Therefore, therapies that assist in reducing the inflammatory process are important resources that minimize the local harmful effects caused by the components of *B. moojeni* venom.

Phonophoresis plays an important role when employed in therapeutic combinations with anti-inflammatory agents, improving permeation and absorption and significantly increasing therapeutic effects with optimization of treatment time. Based on the obtained results, the therapeutic model employed in this study may be an effective treatment option for ophidian accidents.

**Fig. 1.** Chromatogram obtained by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from the EORO analysis, where: **Peak 3** - Limonene (5.08%), **Peak 4** - 1,8-cineole (35.28%) and **Peak 10** - Camphor (46.92%).

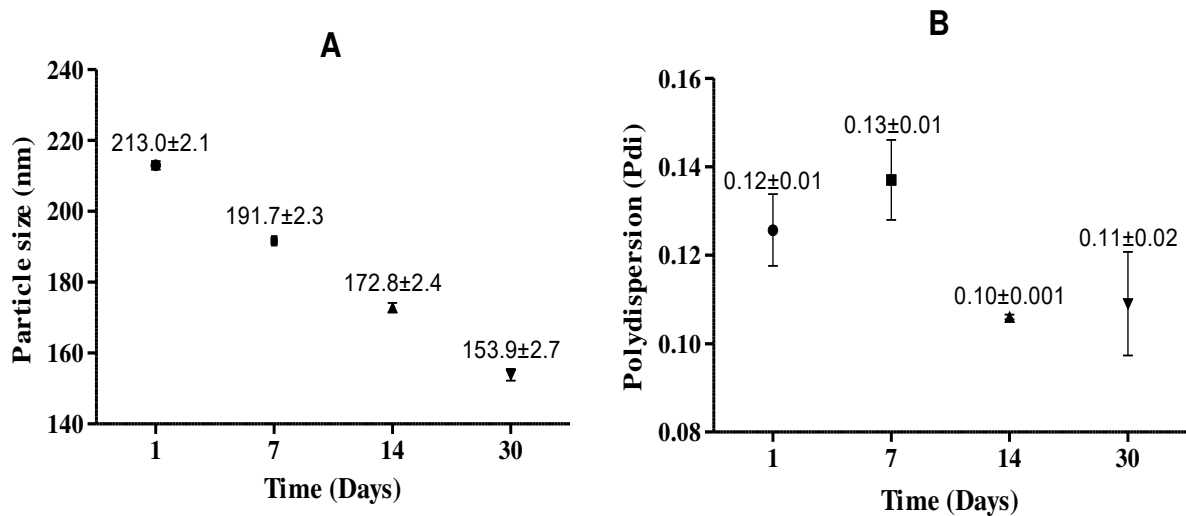


**Table 1.** Chemical constituents of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil (EORO) determined by GC-MS analysis. Rt (Retention time in minutes).

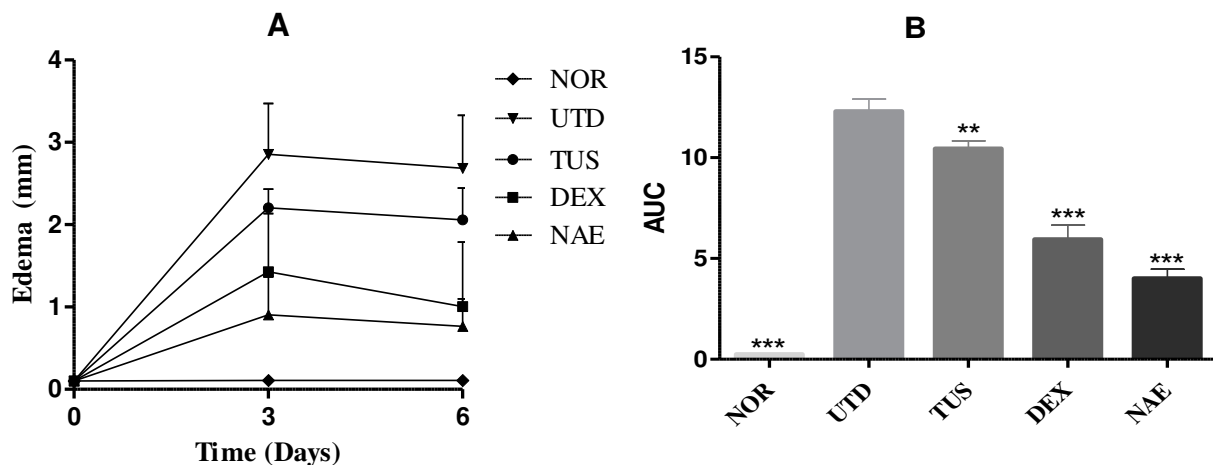
| Peak             | Compound               | Rt (min) | Percentage (%) |
|------------------|------------------------|----------|----------------|
| 1                | $\beta$ -myrcene       | 6.122    | 1.67           |
| 2                | o-cymen                | 6.490    | 0.56           |
| 3                | Limonene               | 8.474    | 5.08           |
| 4                | 1,8-cineole            | 8.708    | 35.28          |
| 5                | $\alpha$ -Terpinene    | 10.549   | 0.70           |
| 6                | Terpinolene            | 10.728   | 1.56           |
| 7                | $\gamma$ -Terpinene    | 11.188   | 0.11           |
| 8                | $\beta$ -linalool      | 11.531   | 0.41           |
| 9                | **                     | 11.639   | 0.23           |
| 10               | Camphor                | 11.927   | 46.92          |
| 11               | Borneol                | 12.478   | 0.62           |
| 12               | $\alpha$ -terpineol    | 12.791   | 0.12           |
| 13               | $\alpha$ -campholenal  | 13.171   | 0.15           |
| 14               | Verbenone              | 13.277   | 0.55           |
| 15               | $\beta$ -caryophyllene | 13.345   | 0.09           |
| Total identified |                        |          | 93.82          |

\*\*Not identified.

**Fig. 2.** Analysis of the *R. officinalis* nanoemulsion (NAE) stability over 30 days. (A) Average variation in particle size, (B) Average variation in polydispersion.

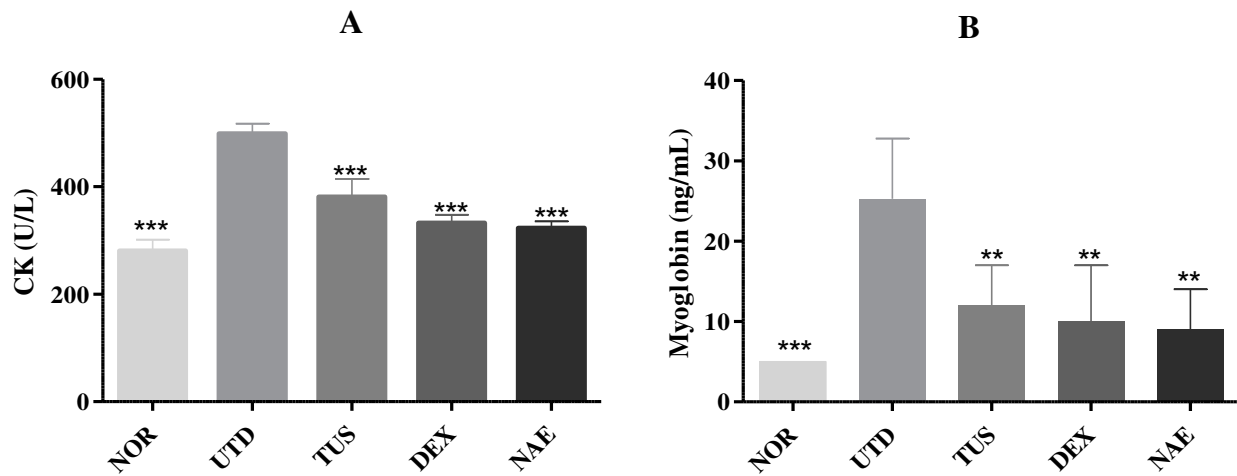


**Fig. 3.** Effect of TUS treatment and DEX (0.5 mg/kg) and NAE (0.5 mg/kg) phonophoresis on inflammation induced by intramuscularly administered *Bothrops moojeni* venom (0.10 mg/kg) in the left gastrocnemius muscle of rats. (A) Expresses the evolution of edema in the muscle (mm) as a function of time (days). (B) Expresses the area under the curve (AUC) obtained from the evolution of edema in the muscle. Results are presented as mean ± SD (n=5 animals/group). Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. \*\*\*(p<0.001), Statistically significant result versus UTD group.

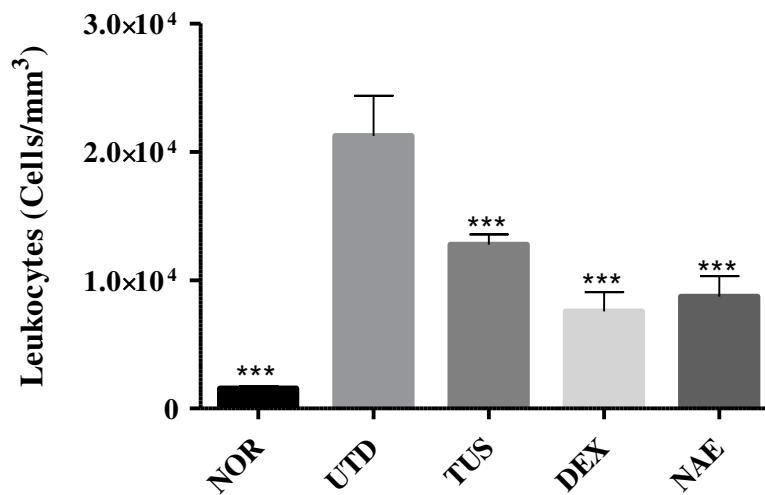


**Fig. 4.** Effect of treatment with TUS and DEX (0.5 mg/kg) and NAE (0.5 mg/kg) phonophoresis on levels of (A) creatine kinase (CK) and (B) serum myoglobin in rats with muscular inflammatory infiltrate induced by application (i.m) of 0.10 mg/kg of *Bothrops moojeni* venom in the gastrocnemius muscle. Results are presented as mean ± SD (n=5 animals). Differences between groups were analyzed

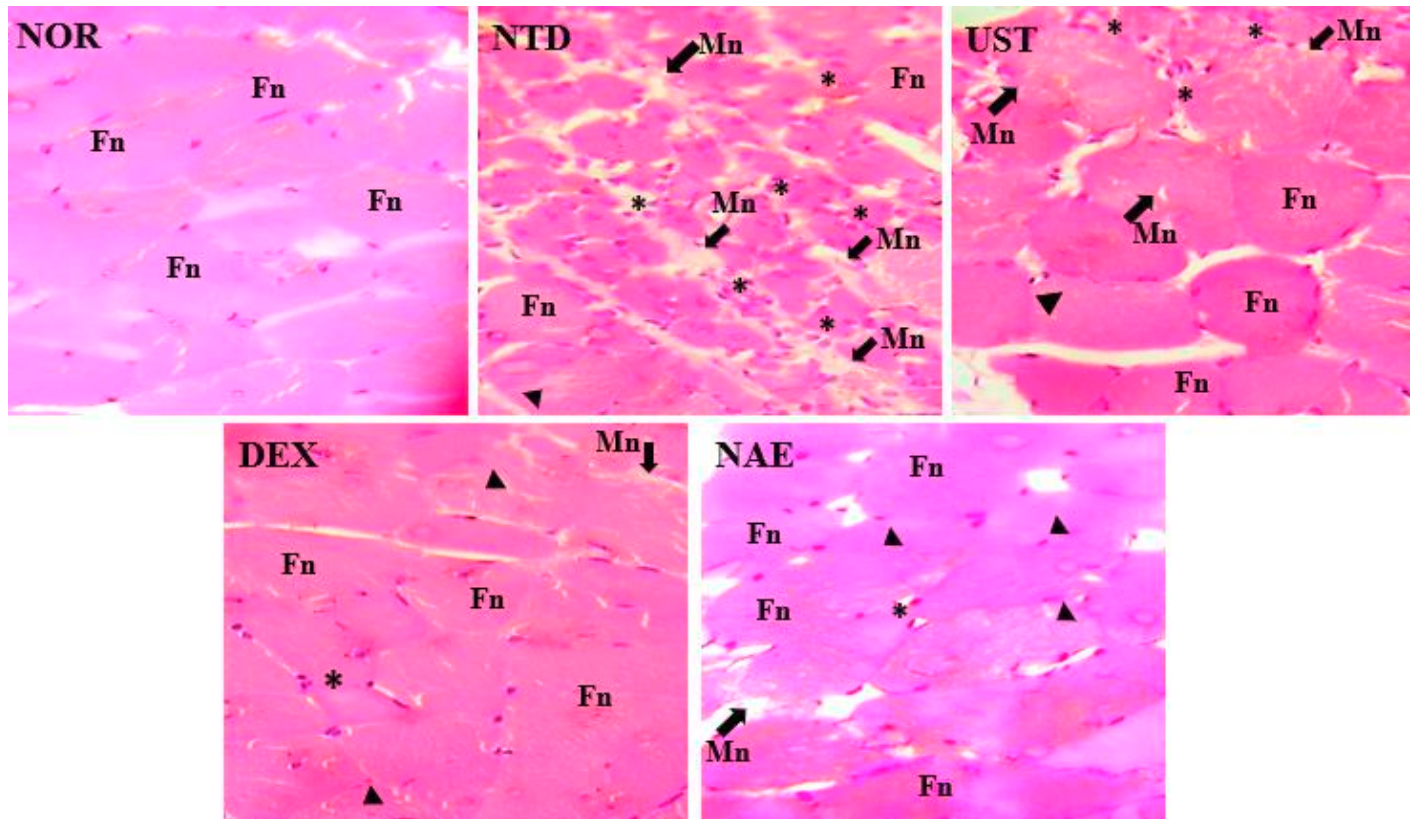
by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. \*\*\*( $p < 0.001$ ), Statistically significant result versus UTD group.



**Fig. 5.** Effect of treatment with TUS and phonophoresis of DEX (0.5 mg/kg) and NAE (0.5 mg/kg) on muscular inflammatory infiltrate induced by application (i.m) of 0.10 mg/kg of *Bothrops moojeni* venom in the left gastrocnemius muscle of rats. Quantification of total leukocytes in the muscle after the treatment period. Results are presented as mean  $\pm$  SD (n=5 animals). Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. \*\*\*( $p < 0.001$ ), Statistically significant result versus UTD group.



**Fig. 6.** Histopathological analysis of the effect of treatment with DEX (0,5 mg/kg) and NAE (0,5 mg/kg) on muscular inflammatory infiltrate induced by application (i.m) of 0.10 mg/kg of *Bothrops moojeni* venom in the left gastrocnemius muscle of mice. **Asterisks:** Leukocyte infiltrate; **Black arrows:** Myonecrosis and muscle fiber destruction, **Arrowheads:** Muscle fibers with little necrosis.



### Abbreviations

- AUC – Area under the curve
- CK – Creatine kinase
- LTB4 - Leukotriene B4
- PGE2 – Prostaglandin E2
- PGI2 – Prostacyclin I2
- TXA2 – Thromboxane A2
- TUS - Therapeutic ultrasound

**Author contributions** DESG, JAA, HOC and KRTP: performed experiments and assays, analyzed data, prepared manuscript. MAS, ALN, AVTLT and HOC: performed experiments and assays, interpreted data, edited manuscript. HOC and JCTC: conceptualization and design of study, assisted with statistical analyses, interpreted data, troubleshooted assays, edited manuscript.

**Data availability** Data will be made available for review as needed upon legitimate request.

### Declarations

**Conflict of interests** The authors have no relevant financial or no-financial interests to disclose.

**Ethical approval** Animal manipulations and handling processes for all experiments were approved by the Ethics Committee of Animals Use from the Federal University of Amapá (CEUA, UNIFAP), under n° 020/2022.

## References

- Alves Barros AS, Oliveira Carvalho H, dos Santos IVF, Taglialegra T, dos Santos Sampaio TI, Duarte JL, et al.(2017) Study of the non-clinical healing activities of the extract and gel of *Portulaca pilosa* L. in skin wounds in wistar rats: A preliminary study. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96:182–190. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.142>.
- Alves MMSR, Nakagome BHY, Traldi MCDC, et al (2019) Análise crítica da dosagem de creatinofosfoquinase no Pronto-Socorro Central do Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo / Critical analysis of the creatine phosphokinase dosage in the Emergency Department of Sao Paulo's Santa Casa de Misericordia Hospital. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo* 64:1. <https://doi.org/10.26432/1809-3019.2019.64.1.001>
- Aguiar WS, Galizio NC, Serino-Silva C, et al (2019) Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. *PLOS ONE* 14:e0222206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222206>
- Alcântara JA, Bernarde PS, Sachett J, et al (2018) Stepping into a dangerous quagmire: Macroecological determinants of *Bothrops* envenomings, Brazilian Amazon. *PLOS ONE* 13:e0208532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208532>
- Assis LM, Zavareze ER, Prentice-Hernández C, Souza-Soares LA (2012) Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology* 15:99–109. <https://doi.org/10.1590/s1981-67232012005000004>
- Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, et al (2019) *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology* 229:29–45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038>
- Borges RS, Lima ES, Keita H, et al (2017) Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. *Inflammopharmacology* 26:183–195. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0374-8>
- Carvalho JCT, Keita H, Santana GR, et al (2017) Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. *Inflammopharmacology* 26:273–284. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0362-z>
- Carvalho HO, Gonçalves DES, Picanço KRT, et al (2021) Actions of *Cannabis sativa* L. fixed oil and nano-emulsion on venom-induced inflammation of *Bothrops moojeni* snake in rats. *Inflammopharmacology* 29:123–135. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00754-y>

- Carvalho HO, Santos IVF dos, Rocha CF da, et al (2018) Effect of the treatment of *Copaifera duckei* oleoresin (copaiba) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28:724–731. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.09.004>
- Capeletti E, Mendes M, Biondo D, Oliveira MMD (2016) Procedência de Serpentes dos Gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (Viperidae) Catalogadas no Serpentário do Jardim Zoológico da Universidade de Caxias do Sul (UCS). *Biota Amazônia* 6:45–51. <https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n3p45-51>
- Cosme MV, Nunes NMF, Oliveira AP de, Oliveira ECA de (2022) Evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil through the *Allium cepa* Leach bioassay. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 44:e62665. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v44i1.62665>
- David AC, Silva LMG, Garcia Denegri ME, et al (2022) Photobiomodulation therapy on local effects induced by juvenile and adult venoms of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 220:106941. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.106941>
- Dos Santos Haupenthal DP, Zortea D, Zaccaron RP, et al (2020) Effects of phonophoresis with diclofenac linked gold nanoparticles in model of traumatic muscle injury. *Materials Science and Engineering: C* 110:110681. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110681>
- Duarte JL, Amado JRR, Oliveira AEMFM, Cruz RAS, Ferreira AM, Souto RNP, et al. (2015). Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Rev Bras Farmacogn* 25: 189–189. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.010>.
- Ely JF, Ely PB, Webster RS, et al (2000) Alterações enzimáticas decorrentes de isquemia muscular esquelética em ratos. *Acta Cirurgica Brasileira* 15:142–145. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502000000300002>
- Félix-Silva J, Gomes JAS, Xavier-Santos JB, et al (2017) Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. *Toxicon* 125:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.260>
- Fernandes CP, Mascarenhas MP, Zibetti FM, Lima BG, Oliveira RPRF, Rocha L (2013). HLB value, an importante parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Braz J Pharm* 23: 108–114. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000127>
- Fonseca FV, Melo MM, Silva J, et al (2004) Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14:26–29. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2004000300011>
- Haupenthal DP dos S, Dias FM, Zaccaron RP, et al (2020) Effects of phonophoresis with ibuprofen associated with gold nanoparticles in animal model of traumatic muscle injury. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 143:105120. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105120>

Irache JM, Esparza I, Gamazo C, et al (2011) Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology* 180:47–71.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.028>

Karthik P, Ezhilarasi PN, Anandharamakrishnan C (2017) Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57:1435–1450.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1006767>

Lima TCP, Almeida AF, Pacheco de Oliveira EC, et al (2020) Desenvolvimento de nanogel de *Copaifera reticulata* sobre a lesão muscular em ratos usando fonoforese. *Saúde e Pesquisa* 13:181–192. <https://doi.org/10.17765/2176-9206.2020v13n1p181-192>

Leal SS, Uchôa VT, Figuerêdo-Silva J, Soares RB, Mota DM, Alencar RC, Maia Filho ALM, Sant'Ana AEG, Junior MB (2016) Eficácia da fonoforese com *Ximenia americana* L. na inflamação de tendão de ratos. *Rev Bras Med Esporte* 22 (05) <https://doi.org/10.1590/1517-869220162205156899>

Maia-Filho ALM, Villaverde AB, Munin E, Aimbire F, Albertini R (2010) Comparative Study of the Topical Application of Aloe Vera Gel, Therapeutic Ultrasound and Phonophoresis on the Tissue Repair in Collagenase-Induced Rat Tendinitis. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 36: 1682-1690, <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.012>

Marchionni AMT, Pagnoncelli RM, Reis SRA (2006). Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual. *Revista Odonto Ciência*, 21(51), 22-29.

Martins M, Maia Filho ALM, Costa CLS, et al (2011) Ação anti-inflamatória da fração lipídica do *Ovis aries* associado ao ultrassom terapêutico em modelo experimental de tendinite em ratos (*Rattus norvegicus*). *Brazilian Journal of Physical Therapy*.

<https://doi.org/10.1590/s1413-35552011000400007>

Menaldo DL, Bernardes CP, Zoccal KF, et al (2017) Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from *Bothrops atrox* venom. *Molecular Immunology* 85:238–247.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.03.008>

Mikulcová V, Kašpárková V, Humpolíček P, Buňková L (2017) Formulation, Characterization and Properties of Hemp Seed Oil and Its Emulsions. *Molecules* 22:700.

<https://doi.org/10.3390/molecules22050700>

Moniz MS, Mascarenhas MI, Escobar C, et al (2017) Rhabdomyolysis as a manifestation of a metabolic disease: a case report. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 29:..

<https://doi.org/10.5935/0103-507x.20170016>

Olsson DC, Martins VMV, Pippi NL, Mazzanti A Tognoli GK (2008) Therapeutic ultrasound in the tissue healing. *Clínica e Cirurgia Cienc. Rural* 38 (4) <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000400051>

Ostertag F, Weiss J, McClements DJ (2012) Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science* 388:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.07.089>

Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al (2018) Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* 16:.

<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

Picanço LCS, Bittencourt JAHM, Henriques SVC, et al (2016) Pharmacological activity of *Costus spicatus* in experimental *Bothrops atrox* envenomation. *Pharmaceutical Biology* 54:2103–2110. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1145703>

Piccolo G, Chacur M, Gutiérrez JM, et al (2002) Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35:1221–1228.

<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2002001000016>

Rodrigues APS, Faria e Souza BS, Alves Barros AS, et al (2020) The effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its nanoemulsion on dyslipidemic Wistar rats. *Journal of Applied Biomedicine* 18:126–135. <https://doi.org/10.32725/jab.2020.016>

Salvador GHM, Borges RJ, Eulálio MMC, et al (2020) Biochemical, pharmacological and structural characterization of BmooMP-I, a new P–I metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Biochimie* 179:54–64. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.001>

Saty P, Jones T, Lopez E, et al (2017) Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods* 6:20. <https://doi.org/10.3390/foods6030020>

Sharp M, Sahin K, Stefan M, et al (2020) Phytoplankton Supplementation Lowers Muscle Damage and Sustains Performance across Repeated Exercise Bouts in Humans and Improves Antioxidant Capacity in a Mechanistic Animal. *Nutrients* 12:1990.

<https://doi.org/10.3390/nu12071990>

Silva JO, Fernandes RS, Ticli FK, et al (2007) Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon* 50:283–291.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.024>

Sousa EA, Bittencourt JAHM, de Oliveira NKS, et al (2013) Effects of a low-level semiconductor gallium arsenide laser on local pathological alterations induced by *Bothrops moojeni* snake venom. *Photochemical & Photobiological Sciences* 12:1895–1902.

<https://doi.org/10.1039/c3pp50036e>

Silva SH, Moresco RN (2011) Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda. *Scientia Medica*, 21, 132-142.

Strauch MA, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, et al (2013) Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *Journal of Ethnopharmacology* 145:50–58. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.033>

Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, et al (2015) Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. *Toxicon* 98:89–97.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.014>

Takayama C, de-Faria FM, de Almeida ACA, et al (2016) Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by

absolute ethanol in the rat. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6:677–681.  
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.027>

Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A, et al (2008) Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Experimental Animal Models. Journal of Medicinal Food 11:741–746. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0524>