

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية  
الشعبية

University Ferhat Abbas  
Setif 1  
Faculty of Natural and Life



جامعة فرحات عباس،  
سétif 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

N° .....

**Master dissertation**

Presented by

**Asma Boulahia**

**Nihal Boudiaf**

**Maroua Karoun**

For the fulfillment of requirements for the diploma of

**MASTER**

Field: **Biology**

Specialty: **Applied Biochemistry**

Topic

**Phytochemical Analysis, Antioxidant Capacity, and Biological Evaluation of  
the Aqueous Extract of *Marrubium Sp***

Presented publicly on 29 / 06 / 2025

**JURY**

President

**Fatima Benchikh**

**PR. UFA Sétif 1**

Promotor

**Walid Mamache**

**SLA. UFA Sétif 1**

Examinator

**Hichem Meziti**

**SLB. UFA Sétif 1**

2024/2025

*Laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases*

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

First and foremost, all praise and glory to **God**, the Most Gracious, the Most Merciful, who granted us strength throughout the challenging times of completing this dissertation.

We extend our warmest thanks to all those who contributed directly or indirectly to the successful completion of this research.

We are especially grateful to Dr. **Walid Maamache**, our research supervisor, for the excellence of his instruction, invaluable guidance, and dedicated support, including his meticulous re-reading and editing of this work. Your insights greatly enhanced the quality of our analysis.

We also wish to thank **Benchikh Fatima** and **Meziti Hichem**, for honoring us by evaluating this modest thesis. Your suggestions and remarks will profoundly influence our future careers in research.

Our gratitude extends to:

To each one, we offer sincere thanks for your intellectual, moral, and technical assistance throughout our journey.

## DEDICATION

بسم الله الرحمن الرحيم

" وَأَخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنْ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ "

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات الحمد لله ما تم جهد ولا ختم سعي الا بفضلله وما تخطى العبد من عقبات وصعوبات الا بتوفيقه ومعونته بفضل من الله اتممت مسيرتي الجامعية بالنجاح. والأولى بالشكر بعد الله عزوجل هما والدي الكريمين إلى روح أبي الحبيب، الذي رحل عن الدنيا لكنه لم يغيب عن قلبي لحظة الذي غمرني بحبه وعطفه، إليك أهدي ثمرة جهدي، وأدعو الله أن يجعل هذا العمل في ميزان حسناتك، وأن يرفع مقامك في جنات النعيم كما رفعتني في حياتك بدعائك وحبك. إلى أمي من علمتني العطاء، وغمرتني بحنانها وكرمها، إلى من علمتني كيف أقف بكل ثبات فوق الأرض، إلى نبع المحبة، إلى من قدمت سعادتني وراحتي على سعادتها رمز الصبر والكفاح، وسندي بعد الله. لولا دعاؤك ووقوفك بجانبني لما وصلت إلى هذا الإنجاز، فلك مني كل الحب والامتنان. إلى اخي (محمد) واختي (انفال) من تسعد عيني بروية وجوهم ويفرح فؤادي بسماع رنات ضحكاتهم وادموني بالقوة والتوجيه وامنوا بي ودعموني في الأوقات الصعبة.

وإلى جدي العزيز. الذي كان لي أباً وسنداً بعد والدي، شكراً ليديك التي أمسكت بي في كل لحظة ضعف، ولكلماتك التي كانت دوماً النور الذي أتبعه وإلى جدتي الحبيبة، التي كانت دعاؤها زاداً لي في كل خطوة، شكراً لوجودكما الذي منحني القوة والعزيمة.

إلى أحب الناس لقلبي وإلى كل من كان داعماً وسنداً لي، إلى من يحبني بصدق وإخلاص، إلى جميع من تلقيت منه النصح والدعم. إلى رفيقة الدرب و صديقة الطفولة منال، إلى حظي من الجامعة مروة ونهال، إن إنهماي عملي لم يكن ليتم لولا دعمكم، وأتمنى أن ينال رضاكم وأهديكم خلاصة جهدي.

إلى أساتذتي الكرام الذين لم يخلوا علينا بعلمهم وتوجيهاتهم، ومن كانت كلماتهم مصابيح أنارت لنا دروب العلم.

BOULAHIA ASMA

## DEDICATION

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ ﴾

إله لا يطيب الليل إلا بشكره، ولا يطيب النهار إلا بطاعته، ولا تطيب اللحظات إلا بذكره... الله جلّ جلاله.

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة، سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم.

انتهت الرحلة. لم تكن الرحلة قصيرة، ولم تكن سهلة، ولم يكن الحلم قريباً. ومهما طالنت فستمضي، بخلوها ومرّها.

وفي هذه اللحظة، أكثر فخراً وامتناً، أهدى هذا العمل إلى من ربّاني وكافح من أجلي، إلى المصباح الذي أثار دربي،

ولمن أحمل اسمه بكل فخر طاب بك العمر يا سيّد الرجال، وطبت لي عمراً. أسأل الله أن يمدّ في عمرك لتري ثماراً قد حان

قطفها والدي العزيز.

وإلى ملاكي في الحياة، قرة عيني، وأعزّ ما أملك. إلى بسمّة الحياة وسرّ الوجود. إلى من كان دعاؤها سرّ نجاحي،

وحنانها بلسم جراحي، إلى غاليّتي، وجنة قلبي، التي رافقتني وأرشدتني في كل مشاوير حياتي أُمّي الغالية، حفظها الله.

إلى ضلعي الثابت الذي لا يميل، إلى من رزقتُ بهم سنداً وملاذي الأول والأخير، إلى من أزالوا من طريقي أشواك

الفشل... إخوتي وأخواتي الأعداء، سندي في الحياة.

وإلى صديقتي العزيزتين مروة وأسماء، رفيقتي في هذا المشوار، من شاركتاني العمل والسهر والتعب، وكنّ لي دعماً

حقيقياً في كل خطوة من خطوات إنجاز هذه المذكرة، أقول لكما: شكراً من القلب، فنجاحي اليوم هو نجاحنا جميعاً.

وإلى أستاذتي الكرام الذين قدّموا لنا يد العون ولم يبخلوا علينا بدعمهم ومساندتهم، وكانوا سبباً في توجيهنا وإتمام هذا

العمل، جزاهم الله عنا كل خير.

الحمد لله على حسن التمام والختام.

BOUDIAF NIHAL

## DEDICATION

بسم الله الرحمن الرحيم

( اَقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ )

الحمد لله الذي بفضلله وتوفيقه أكمل هذا البحث، وأسأل أن ينتفع به الجميع.

أهدي هذا الجهد المتواضع إلى:

والدَيَّ العزیزین، اللذین كانا دعائم صبري وسندي في كل مراحل حياتي، ووقفا جنبي بحب غير مشروط وصبر لا

ينضب، أخي وأخواتي الأحباء، اللذين شاركوني الفرح والتعب، وكانوا مصدر دعم ومواساة في اللحظات الصعبة.

أساتذتي الكرام، اللذين زرعوا في حب العلم والعطاء، ونقلوا إلي خبرتهم وصلقوا معارفهم بحب وإخلاص، أصدقائي

وزملائي الأوفياء، اللذين زادوا هذه الرحلة جمالاً بروح الفريق والتشجيع المستمر.

كل من آمن بي وساندني، سواء بكلمة طيبة، نصيحة، دعم معنوي أو مادي، فلکم مَنِّي أعمق امتنان.

وإلى كل من كان له أثر في إنجاز هذا العمل، سواء بشكل مباشر أو غير مباشر، أقول: لكم جزيل الشكر، وأسأل الله

أن يجعل ما بذلتموه وسعيتم فيه متقبلاً وخالصاً لوجهه الكريم.

**KAROUN MAROUA**

## Contents

List of figures.....	
List of tables.....	
List of abbreviations.....	
المخلص.....	
Abstract.....	
1. Introduction .....	1
2. Materials and Methods .....	3
2.1. Preparation of the aqueous extract.....	3
2.2. Dosage of polyphenols .....	3
2.3. Dosage of flavonoids .....	4
2.4. Dosage of tannins .....	4
2.5. DPPH radical scavenging assay .....	5
2.6. ABTS radical scavenging assay .....	5
2.7. Reducing Power Test (Phenanthroline Method) .....	6
2.8. Ferrous ion chelating activity .....	6
2.9. Acute oral toxicity .....	6
2.9.1. Renal and hepatic assessment.....	7
2.9.2. Preparation of homogenate.....	7
2.10. Intestinal transit and gastric emptying.....	9
3. Statistical analysis .....	9
4. Results .....	10
4.1. Extraction yield .....	10
4.2. Total polyphenols, flavonoids and tannins content .....	10
4.3. <i>In vitro</i> antioxidant activity .....	10
4.3.1. DPPH radical scavenging assay .....	10
4.3.2. ABTS radical scavenging assay .....	10
4.3.3. Ferrous ion chelating activity .....	11

4.3.4.	Reducing Power Test (Phenanthroline Method) .....	11
4.4.	Acute oral toxicity .....	11
4.4.1.	Effect of the MAqE on body weight .....	11
4.4.2.	Biochemical parameters .....	12
4.4.3.	Effect of MAqE on Catalase Activity.....	13
4.4.4.	Effect of MAqE on total protein level.....	13
4.4.5.	Effect of MAqE on MDA level .....	14
4.4.6.	Effect of MAqE on GSH levels.....	15
4.5.	Effects of MAqE on IT and GE.....	15
4.5.1.	Effects of MAqE on IT .....	15
4.5.2.	Effects of MAqE on GE .....	16
5.	Discussion.....	18
6.	Conclusion and prospectives .....	22
7.	References .....	23

## List of figures

Figure 1. Gallic acid calibration line for the dosage of polyphenols.....	3
Figure 2. Quercetin calibration line for the dosage of flavonoids .....	4
Figure 3. Tannic acid calibration line for the dosage of tannins. ....	5
Figure 4. Variation in the enzymatic activity of transaminases, alkaline phosphatase and creatinine after 14 days of treatment with MAqE at 2 and 5 g/kg in the experimental groups. ....	12
Figure 5. Effect of MAqE on CAT activity in liver and kidney of rats. ....	13
Figure 6. Effect of MAqE on total protein level in liver and kidney of rats. ....	14
Figure 7. Effect of MAqE on MDA level in liver and kidney of rats. ....	14
Figure 8. Effect of MAqE on reduced glutathione level in liver and kidney of rats. ....	15
Figure 9. Effects of MAqE on IT in mice. ....	16
Figure 10. Effects of MAqE on GE in mice. ....	17

## List of tables

Table 1. characterization and extraction yield of the aerial part of <i>Marrubium sp</i> .....	10
Table 2. Content of polyphenols, flavonoids, tannins MAqE .....	10
Table 3. Antioxidant activity of MAqE.....	11
Table 4. Effects of MaqE on rat's body weight.....	11

## List of abbreviations

ABTS:(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)).

ABS: Absorbance.

AlCl<sub>3</sub>: Aluminum Chloride.

ALP: Alkaline Phosphatase.

ALT: Alanine Aminotransferase.

ANOVA: Analysis of Variance.

AST: Aspartate Aminotransferase.

BHT: Butylated Hydroxytoluene.

CAT: Catalase.

CMC: Carboxymethyl Cellulose.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

DTNB: 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid).

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid.

FeCl<sub>3</sub>: Ferric chloride.

FeCl: Ferrous chloride.

GE: Gastric emptying.

GSH: Reduced Glutathione.

I%: Percentage of anti-free radical activity.

IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration.

IT: Intestinal transit.

MAqE: *Marrubium* aqueous extract.

MDA: Malondialdehyde.

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Sodium Carbonate.

NC: Negative Control.

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development.

OS: Oxidative Stress.

ROS: Reactive oxygen species.

SD: Standard Deviation.

SEM: Standard Error of the Mean.

TBA: Thiobarbituric Acid.

TNB: 2-Nitro-5-thiobenzoate.

## المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التركيب الكيميائي النباتي، النشاط المضاد للأكسدة، والتأثيرات البيولوجية للمستخلص المائي من الأجزاء الهوائية لنبات *Marrubium sp*. أسفر الاستخلاص عن مسحوق بني داكن بمرودود بلغ 8.5%. أظهر الفحص الكيميائي النباتي احتواء المستخلص على نسب مرتفعة من البوليفينولات (65.6 ملغ حمض الغاليك المكافئ/غرام من المستخلص الجاف)، والدباغ (60.46 ملغ حمض التانيك المكافئ/غرام من المستخلص الجاف)، والفلانويدات (3.72 ملغ كيرسيتين مكافئ/غرام من المستخلص الجاف). تم تقييم الفعالية المضادة للأكسدة باستخدام عدة اختبارات مخبرية شملت DPPH، ABTS، تخليب المعادن، واختبار قدرة الاختزال. أظهر المستخلص نشاطاً مضاداً للأكسدة ملحوظاً، حيث بلغت قيم  $IC_{50}$  لكل من DPPH و ABTS على التوالي 86.62 و 26.27 ميكروغرام/مل، بالإضافة إلى فعالية في تخليب أيونات الحديد ( $IC_{50} = 38.97 \pm 1.28$ ) ميكروغرام/مل وقدرة اختزال ( $A_{0.5} = 399.01 \pm 18.33$ )، وهي أقل بكثير من القيم المسجلة للمعايير القياسية.

في الاختبارات الحية للسمية الحادة، لم تُلاحظ أي تغييرات معنوية في الأوزان الكلية أو اوزان الأعضاء لدى الجرذان التي عولجت فموياً لمدة 15 يوماً بجرعتي 2 و 5 غ/كغ من المستخلص. أظهرت التحاليل البيوكيميائية انخفاضاً معنوياً في ( $22.12 \pm 82.41$ ) و ( $80.66 \pm 143.67$ ) ALT و ( $12.7 \pm 100.67$ ) وحدة دولية/لتر) و ALP مستويات إنزيمات معنوياً. كما بقيت مستويات الكرياتينين ( $AST = 13.37 \pm$  وحدة دولية/لتر) مقارنة بالشاهد، في حين لم يكن الانخفاض في لم تُظهر مؤشرات الإجهاد التأكسدي في أنسجة الكبد والكلية تغييرات. ثابتة، مما يدل على عدم وجود تأثير سام على الكلى في الكبد GSH أو نشاط إنزيم الكاتالاز. ومع ذلك، لوحظ انخفاض معنوي في مستويات MDA معنوية في مستويات ( $7.23 \pm 0.34$ )، مصحوباً بانخفاض كبير في محتوى البروتين الكلي ( $2.13 \pm$  ميكرومول/غرام و  $0.20 \pm 0.67$ ) أو البروتين الكلي في أنسجة GSH في المقابل، لم تسجل تغييرات معنوية في. على التوال و  $0.53 \pm 4.66$  مل/كغ الكلى أما فيما أما في ما يتعلق بالنشاط الفسيولوجي، فقد أظهر المستخلص تأثيراً مثبطاً لحركة الجهاز الهضمي لدى الفئران، حيث بلغت نسبة التخفيض في العبور المعوي  $71.38 \pm 1.56\%$  عند جرعة 50 مغ/كغ و  $69.68 \pm 3.55\%$  عند جرعة 100 مغ/كغ. وبالنسبة لإفراغ المعدة، فقد تم تسجيل انخفاض واضح بنسبة  $33.39 \pm 23.85\%$  عند جرعة 100 مغ/كغ، وهي نسبة أعلى من تلك التي سُجلت مع الأتروبين، مما يشير إلى فعالية محتملة للمستخلص كمحفز لارتخاء الجهاز الهضمي.

. يظهر المستخلص المائي لنبات *Marrubium sp* خصائص واعدة كمضاد للأكسدة ومنظم لحركة الجهاز الهضمي، بالإضافة إلى أمان جيد عند الجرعات المختبرة. تدعم هذه النتائج الاستخدام التقليدي لهذا النبات في الطب الشعبي، وتبرز إمكانيته للتطوير المستقبلي كعلاج طبيعي في عدة تطبيقات دوائية.

الكلمات المفتاحية: *Marrubium sp*؛ مستخلص مائي؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ السمية الحادة؛ حركة الأمعاء.

## Abstract

The present study investigates the phytochemical composition, antioxidant activity, and biological effects of the aqueous extract from the aerial parts of *Marrubium sp* (MAqE). The extraction yielded a dark brown powder with a yield of 8.5%. Phytochemical screening revealed high levels of polyphenols (65.6 mg EGA/g dry weight of extract), tannins (60.46 mg ETA/g dry weight of extract), and flavonoids (3.72 mg EQ/g dry weight of extract).

Antioxidant potential was evaluated through various *in vitro* assays, including DPPH, ABTS, metal chelation, and reducing power tests. The extract showed high antioxidant activity, with  $IC_{50}$  values of 86.62  $\mu$ g/mL (DPPH) and 26.27  $\mu$ g/mL (ABTS). The extract also demonstrated ferrous ion chelating activity ( $IC_{50} = 38.97 \pm 1.28$   $\mu$ g/mL) and reducing power ( $A_{0.5} = 399.01 \pm 18.33$ ), these values were significantly lower than standards.

*In vivo*, in acute toxicity, rats treated orally for 15 days with 2 and 5 g/kg doses of the extract showed no significant changes in body or organ weights. Serum biochemical parameters revealed significant decreases in ALP ( $143.67 \pm 12.7$  and  $100.67 \pm 5.78$  IU/L), ALT ( $82.41 \pm 22.12$  and  $80.66 \pm 13.37$  IU /L), and a non-significant decrease in AST. Serum creatinine levels remained unchanged, confirming no nephrotoxicity.

Oxidative stress markers in liver and kidney tissues showed no significant changes in MDA levels or CAT activity. However, liver GSH levels significantly decreased ( $2.69 \pm 0.67$  and  $2.13 \pm 0.20$   $\mu$ mol/g), accompanied by a significant reduction in total protein content ( $7.23 \pm 0.34$  and  $4.66 \pm 0.53$  mg/ml; respectively). Kidney GSH and total protein levels showed no significant differences.

Liver and kidney catalase and MDA levels remained stable, though total protein and GSH levels in liver tissues decreased at higher doses.

Additionally, the extract inhibited gastrointestinal motility in mice, reducing IT in a dose-dependent manner with  $71.38\% \pm 1.56$  at a dose of 50 mg/kg and  $69.68\% \pm 3.55$  at a dose of 100 mg/kg. As for gastric emptying, a significant decrease of  $33.39\% \pm 23.85$  was recorded at the 100 mg/kg dose, which is higher than that observed with atropine, suggesting potential antispasmodic activity.

In conclusion, the MAqE exhibits promising antioxidant and gastrointestinal regulatory properties, with a favorable safety profile. These results support its traditional medicinal use and highlight its potential for further development in therapeutic applications.

**Key words:** *Marrubium sp*; Aqueous extract; Antioxidant activity; Acute toxicity; intestinal motility.

## 1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) play a dual role in biological systems. At low to moderate concentrations, they serve as redox signaling mediators that are crucial for the normal physiological functioning of cells a state referred to as good stress or eustress Azzi (2022) . In contrast, when present at moderate to high concentrations, ROS can damage all types of biomolecules, including proteins, DNA, and membrane lipids. This harmful condition, marked by an imbalance between ROS production and the antioxidant defense system in favor of ROS, is known as oxidative stress (Sies, 2023) .

Oxidative stress (OS) has been linked to a wide range of diseases, including cardiovascular disease, lung disease, chronic kidney disease (Hajam *et al.*, 2022), cancer, diabetes, infections, and inflammation (Rudrapal *et al.*, 2022). It also plays a significant role in neurodegenerative diseases like Alzheimer's (Forman and Zhang, 2021). Additionally, OS can affect gastrointestinal motility(Vona *et al.*, 2021).

Antioxidants are compounds that inhibit the oxidation of molecules and protect the body from the effects of free radicals. They are found in fruits, seeds, foods (Rahaman *et al.*, 2023), and medicinal plants which are rich in flavonoids and phenols known for their antioxidant activity (Zafar *et al.*, 2023). The genus *Marrubium* which belongs to the Labiatae (Lamiaceae) family and includes 97 species such as *M. vulgare*, *M. parviflorum*, *M. globosum*, *M. peregrinum*, *M. deserti* and *M. alysson*. This plants grow mainly in temperate areas of Europe, North Africa and Asia (Ibrahim *et al.*, 2023). The first who describe *Marrubium sp* was Wood and Bache in 1847 is a small tree with fibrous roots and numerous stems, which are quadrangular, erect, very downy and from 12 to 18 inches high. Its leaves are roundish ovate, dentate or deeply serrate, wrinkled, veined hoary on surface and supported in pairs(Lodhi *et al.*, 2017). Historically, this plant has been used in traditional medicine for treating respiratory tract infections, inflammatory conditions, pain (Aitbaba *et al.*, 2024), cough, rheumatoid arthritis and loss of appetite (Ali Esmail *et al.*, 2021). The traditional uses in Algeria showed that this plant is used in the treatment of several diseases (fever, digestive pathologies pain) (Saad *et al.*, 2022), wound healing and disinfection, diabetes, high blood pressure, and respiratory diseases (Boutabia *et al.*, 2020). *Marrubium sp* produce a variety of bioactive compounds, such as polyphenols (Caffeic acid, p-Coumaric acid, ferulic acid), flavonoids (Catechin, Quercetin, Luteolin, Apigenin), and tannins are present in the aqueous extract(Michalak *et al.*, 2024). The plant has also demonstrated a range of health-promoting effects: antioxidant, antimitotic, antidiabetic, antimicrobial (Gourich *et al.*, 2023) and antifungal activity (Pehlivan *et al.*, 2021).

However, despite the numerous medicinal properties attributed to species of the *Marrubium* genus, scientific data regarding their detailed phytochemical composition and biological effects remain limited, particularly for lesser-studied local species. This raises a central question: What are the phytochemical constituents present in the aqueous extract of *Marrubium* sp., and to what extent does this extract exhibit antioxidant capacity and beneficial biological effects?