الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

University Ferhat abbas

Setif 1

Faculty of nature and life sciences

جامعة فرحات عباس
سطيف 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

Department of Biochemistry

Master thesis

Presented by

Bara Yasmine

Belatel Mohamed Khaled

Benmeziane Hibat allah

For the fulfillment for the diploma of

Master

Field: Biology

Specialty: Applied Biochemistry

Topic

Assessment of biological activities of *Marrubium sp* hydroethanolic extract

Jury

President	Benabdallah Hassiba	Pr. UFA Setif 1
Promotor	Mamache walid	SLA. UFA Setif 1
Examinator	Meziti Hicham	SLB. UFA Setif 1

2024/2025

Laboratory of phytotherapy Applied to chronic diseases

Acknowledgments

First of all, we would like to express our gratitude to God for guiving us strength and patience.

We extend our sincere thanks to Dr. MAMACHE Walid for proposing this research topic to us. We are grateful for your trust, support, availability, and the invaluable guidance you provided us throughout this work. Your assistance and critical insights were tremendously helpful during our research

Next, we would like to express our deepest gratitude to the members of the jury, Pr. Benabdallah Hassiba and Dr. Meziti Hicham, for graciously accepting to examine and evaluate our work.

We would also like to thank Prof. AMIRA Smain (Head of team Effect of Natural Products), for his permission to assess our practical part in the laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases.

Table of content

Abstract

The present study investigated the phytochemical content, antioxidant activity, toxicological effects of *Marrubium* hydroethanolic extract (MHE), and its impact on gastric emptying (GE) and intestinal transit (IT) rates. The extraction yield was 21.66%. Quantitative analysis revealed high levels of bioactive compounds, including total polyphenols (95 ±1.010 GAE µg/mg), flavonoids (54.43 ± 11.37 QE µg/mg), and tannins (77.06 ± 0.47 TAE µg/mg). MHE exhibited notable antioxidant properties across multiple assays: DPPH radical scavenging (IC_{50} = 98.86 ± 2.09 µg/mL), ABTS assay (IC_{50} = 24.40 ± 1.24 µg/mL), ferrozine-based iron chelation (IC_{50} = 210.71 ± 1.59 µg/mL), and phenanthroline-based reducing power (EC_{50} = 560.18 ± 20.47 µg/mL).

Acute toxicity studies revealed no mortality or behavioral alterations, even at high doses (up to 5 g/kg). Biochemical assays showed a significant reduction in hepatic enzymes (ALP, AST, ALT), while creatinine levels remained stable, suggesting hepatoprotective activity without nephrotoxicity. At the 5 g/kg dose, oxidative stress biomarkers showed improved antioxidant defense: glutathione (GSH) levels were 2.10 ± 0.24 µmol TNB/g in kidneys and 4.06 ± 0.82 µmol TNB/g in liver tissue; malondialdehyde (MDA) levels were 43.6 nmol/g in kidney tissue and 34.87 nmol/g in liver. Catalase (CAT) activity reached 5.85 ± 0.33 mmol/min/mg (kidney) and 6.86 ± 4.1 mmol/min/mg (liver), while total protein content was 4.56 ± 0.26 mg/mL in kidneys and 6.24 ± 0.55 mg/mL in liver.

Gastric emptying and Intestinal transit evaluations showed that MHE at 100 mg/kg significantly inhibited gastric emptying (32.9%), whereas the 50 mg/kg dose showed no significant difference from the control (24.4%). Both doses exhibited similar significant inhibition effects on intestinal transit (13-14%). These findings support the potential therapeutic use of MHE as an antioxidant and hepatoprotective agent with gastrointestinal inhibition effects.

Key words: *Marrubium sp*, antioxidant activity, gastric emptying, intestinal transit and acute toxicity.

الملخص

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم المحتوى الكيميائي النباتي، والنشاط المضاد للأكسدة، والسمية، وتأثير مستخلص الإيثانولي المائي لنبات Marrubium hydroethanolic extract (MHE) على معدلات إفراغ المعدة (GE) وحركة الأمعاء الدقيقة (IT). بلغت نسبة مردود الاستخلاص 21.66%. أظهرت التحاليل الكمية احتواء المستخلص على مستويات مرتفعة من المركبات النشطة حيويًا، شملت: عديدات الفينول (95 ± 1.010 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مليغرام)، الفلافونويدات (54.43 ± 11.37 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مليغرام)، والدباغ (77.06 ± 0.47 ميكروغرام مكافئ حمض التانيك/مليغرام).اظهرمستخلص MHE خصائص مضادة للاكسدة عبر اختبارات متعدد: DPPH(IC_{50}=98.86±2.09ميكروغرام/مل)،ABTS (IC_{50}=24.40±1.24ميكروغرام/مل)، Ferrozine based ion chelating activiy (IC_{50}=210.71± 1.59ميكروغرام/مل) وphenantroline reducing power (EC_{50}=560.18±20.44ميكروغرام /مل) .

أظهرت دراسة السمية الحادة عدم وجود وفيات او تغيرات سلوكية حتى عند جرعات مرتفعة (حتى 5غرام/كيلوغرام). كما أظهرت التحاليل البيوكيميائية انخفاضا معنويا في انزيمات الكبد (ALT, AST,ALP) بينما بقيت مستويات الكرياتينين مستقرة، ما يشير الى تأثير وقائي للكبد دون سمية كلوية. عند جرعة 5 غرام/كيلوغرام، أظهرت مؤشرات الاجهاد التأكسدي تحسنا في النظام المضاد للأكسدة: الجلوتاثيون (GSH):2.10 ± 0.24 ميكرومول TNB/غرام (الكلى) و4.06 ± 0.82 ميكرومول TNB/غرام (الكبد)، المالون (MDA): 43.59 ± 4.19 نانومول/غرام (لكلى) و34.87 ± 2.41 نانومول/غرام (الكبد). نشاط إنزيم الكاتالاز (CAT):5.85 ± 0.33 ميليمول/دقيقة/ميليغرام (الكلى) و6.86 ± 4.1 ميليمول/دقيقة/ميليغرام (الكبد). محتوى البروتين الكلي: 4.56 ± 0.26 ميليغرام/مل (الكلى) و6.24 ± 0.55 ميليغرام/مل (الكبد).

أظهرت تقييمات افراغ المعدة (Gastric emptying) وحركة الأمعاء الدقيقة (Intestinal transit) ان مستخلص (MHE) بجرعة 100 ملغ/كغ تثبيطا معنويا لإفراغ المعدة بنسبة (32.9%), في حين أن جرعة 50 ملغ/كغ لم تظهرفرقا معنويا مقارنة مع المجموعة الشاهدة (24.4%).أما في ما يتعلق حركة الأمعاء الدقيقة , فقد أظهرت كلتا الجرعتين تأثيرا مثبطا متشابها و بنسب متقاربة (13-14 %).تدعم هذه النتائج الاستخدام العلاجي المحتمل لمستخلص Marrubium hydroethanolic extract كمضاد أكسدة و كمركب يتمتع بخصائص وقائية للكبد , إضافة الى تأثيراته المثبطة على وظائف الجهاز الهضمي.

الكلمات المفتاحية: مستخلص Marrubium hydroethanolic extract (MHE)، النشاط المضاد للأكسدة، افراغ المعدة، حركة الأمعاء الدقيقة والسمية.

Liste of abbreviations

ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
$AlCl_3$: Aluminum chloride
ALP: Alkaline Phosphatase
ALT: Alanine Aminotransferase
AST: Aspartate Aminotransferase
Atr: Atropine
CAT: Catalase
CMC: Carboxymethylcellulose
Creat: Creatinine
DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB: 5,5′-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
EC_{50}: Half maximal effective concentration
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
FCR: Folin-Ciocalteu reagent
GAE: Gallic acid equivalent
GE: Gastric emptying
GSH: Reduced glutathione
$H_3PMo_{12}O_{40}$: Phosphomolybdic acid
$H_3PW_{12}O_{40}$: Phosphotungstic acid
HE: Hydroethanol
HPLC: High-performance liquid chromatography
IC_{50}: Half maximal inhibitory concentration
IT: Intestinal transit
LD_{50}: Median lethal dose
MDA: Malondialdehyde
MHE:*Marrubium* hydroethanol extract
Na_2CO_3: Sodium bicarbonate
NaOH: Sodium hydroxide
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
P: Weight
QE: Quercetin equivalent
rpm: Revolutions per minute
ROS: Reactive Oxygen Species
RNS: Reactive Nitrogen Species
SD: Standard deviation
SEM: Standard error of the mean
TAE: Tannic acid equivalent
TBA: Thiobarbituric acid
TCA: Trichloroacetic acid

Liste of figures

List of tables

Introduction