

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

CHIKH Nassima

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie Fondamentale

Thème

Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de *Malva sylvestris*

Encadrant	Dr. BOUALI Waffa	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice 1	Dr. MKEDDER Ilham	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice 2	Dr. M'HAMED Imane	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2020/2021

تقييم قوة مضادات الميكروبات من مستخلصات *Malva sylvestris*

تعد الخبيزة واحدة من النباتات الطبية الأكثر استخداما لخصائصها العلاجية من أجل علاج الأمراض المختلفة و الغرض من هذه الدراسة هو تحليل ثلاث مقالات لكل من (Zare et al., (2012) ، (Shadid et al., (2021) و (Razavi et al., (2011) واخرون حول تقييم النشاط المضاد للميكروبات لبض الجزيئات النشطة بيولوجيا في مواجهة السلالات البكتيرية والفطرية بطرق مختلفة: عن طريق الانتشار على وسط مولر هنتون اغار وتحديد التركيز الادنى المثبط. أظهر كل من المستخلص الميثانولي و الأسيونوني تأثيرا مثبطا على البكتيريا Gram سلبية مثل الإشريكية القولونية (PTCC 1047) ، بروتيوس فولغاريس (ATCC-838) بتركيز يتراوح ما بين 0.031 و 0.078 ملغ / مل ، متبوعا بالمستخلص الايثانولي الذي أظهر نشاطا مثبطا ضد البكتيريا Gram موجب مثل المكورات العنقودية بوجين بتركيز 0.4 ملغ/مل، في حين ان المستخلص الايكساني ليس له أي تأثير تجاه سلالات البكتيريا Gram موجب وسليبي باستثناء الإشريكية القولونية (ATCC-25922). كما ان أفضل للتركيز المثبط الأدنى المسجل في هذه الدراسة كان للمستخلص الميثانولي بتركيز 0.019 ملغ / مل ضد الفطر الأسود. في الختام ، فان مستخلصات *Malva sylvestris* لها نشاطا واسعا مضادا تجاه السلالات الميكروبية المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية : *Malva sylvestris* ، مستخلص نباتي ، نشاط مضاد للميكروبات ، التركيز الادنى المثبط.

Résumé :

Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de *Malva sylvestris*

La mauve sylvestre est l'une des plantes médicinales les plus utilisées depuis longtemps pour leurs propriétés thérapeutiques afin de traiter diverses pathologies. La présente étude vise à analyser trois articles de Zare et al., (2012), Shadid et al., (2021) et Razavi et al., (2011), sur l'évaluation du pouvoir antimicrobien de certains composés actifs vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques par différentes méthodes : par diffusion sur milieu Muller Hinton Agar et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). L'extrait méthanolique et l'extrait acétonique ont montré un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* (PTCC 1047), *Proteus vulgaris* (ATCC-838) les CMI obtenus sont de l'ordre 0,031 et 0,078 mg/ml, suivie par l'extrait éthanolique qui a montré une activité inhibitrice contre des bactéries à Gram positif comme *Streptococcus pyogenes* avec une CMI d'ordre de 0,4 mg /ml, tandis que, l'extrait hexanique ne possède aucun effet vis-à-vis des souches bactérienne à Gram positif et à Gram négatif à l'exception d'*Escherichia coli* (ATCC-25922). La meilleure concentration minimale inhibitrice enregistrée dans cette étude était de l'extrait méthanolique est de l'ordre 0,019 mg/mL contre *Aspergillus niger* (PLM 1140). En conclusion, les extraits de *Malva sylvestris* présentent un large spectre d'activités vis-à-vis des souches microbiennes pathogènes.

Mots clés: *Malva sylvestris*, Extraits végétal, Activités antimicrobiennes, CMI.

- Razavi, S. M., Zarrini, G., Molavi, G., Ghasemi, G. Bioactivity of *Malva sylvestris* L., a medicinal plant from Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2011, Vol. 14(6), pp. 574- 579.
- Shadid, K. A., Shakya, A. K., Naik, R. R., Jaradat, N., Farah, H. S., Shalan, N., Khalaf, N.A. Oriquat, G. A. Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L. Leaves Extract. *Journal of Chemistry*, 2021, Vol. 2021, pp.1 - 10.
- Zare, P., Mahmoudi, R., Shadfar, S., Ehsani, A., Afrazeh, Y., Saeedan, A., Niyazpour, F., Pourmand, B. S. Efficacy of chloroform, ethanol and water extracts of medicinal plants, *Malva sylvestris* and *Malva neglecta* on some bacterial and fungal contaminants of wound infections. *J Med Plants Res*, 2012, Vol. 6, pp. 4550-4552.

Abstract :

Evaluation of the antimicrobial power of *Malva sylvestris* extract

High mallow is one of the most widely used medicinal plants since a long time for its therapeutic properties to treat various pathologies. The present study aims to analyze three articles for **Zare et al., (2012)**, **Shadid et al., (2021)** and **Razavi et al., (2011)**, on the evaluation of the antimicrobial power of certain active compounds vis-a-vis bacterial and fungal strains using different methods: the diffusion on Muller Hinton Agar medium and the determination of the minimal concentration inhibitory (MIC). The methanolic extract and the acetone extract have showed an inhibitory effect on Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* (PTCC 1047), *Proteus vulgaris* (ATCC-838) the MICs obtained are of the order of 0.031 and 0.078 mg / ml, followed by the Ethanolic extract which showed inhibitory activity against Gram-positive bacteria such as *Streptococcus pyogenes* with an MIC of order of 0.4 mg / ml, while, the hexane extract has no effect against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains except for *Escherichia coli* (ATCC-25922). The best minimal inhibitory concentration registered in this study was methanolic extract of the order of 0.019 mg / mL against *Aspergillus niger* (PLM 1140). to conclud, *Malva sylvestris* extracts show a broad spectrum of activity against pathogenic microbial strains.

Keywords: *Malva sylvestris*, Plant extracts, Antimicrobial activities, CMI.

Remerciement

Avant toutes, je remercie Dieu « Allah », le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la Patience, la volonté durant toutes ces années.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de mémoire, Madame BOUALI maître de conférences classe A, à la faculté des sciences et de la nature et la vie, Université d'Aboubekr Belkaïd, Tlemcen de m'avoir encadré, orienté, ce travail avec gentillesse et bienveillance, sa disponibilité, et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

J'adresse mes plus sincères remerciements et ma plus profonde gratitude à nos examinatrices, Mme Mkadder Ilham maître de conférences classe B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, à l'Université d'Aboubekr Belkaïd, Tlemcen et Mme M'HAMED Imane maître de conférences classe B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, à l'Université d'Aboubekr Belkaïd, Tlemcen pour l'honneur de bien vouloir examiner ce travail.

Je remercie également toute l'équipe pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Tlemcen.

Enfin, je n'oublie pas de dire merci à toutes les personnes qui m'ont contribué au mon succès.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

- ✓ A mes chers parents pour leur soutien constant, encouragement, conseils, et leur sacrifices consentis pour ma réussite.
- ✓ A mes chers frères Abdelbasset, Abdellatif et Ilyes pour leurs précieux conseils et encouragement.
- ✓ A tous les personnes qui m'ont contribué au mon succès.

Liste des abréviations

ATCC: American type culture collection

A. niger: *Aspergillus niger*

C. albicans :*Candida albicans*

°C : Degré Celsius.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DI : Diamètre d'inhibition.

E.coli : *Escherichia coli*

h: Heure

g : Gramme

µL : Microlitre.

mg/mL : Milligramme par millilitre.

mg : Milligramme

ml : millilitre

M. sylvestris : *Malva sylvestris*

min: minute

PDA : Potato Dextrose Agar

PTCC: Persian Type Culture Collection

P.vulgaris :*Proteus vulgaris*

P.aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. pyogenes : *Streptococcus pyogenes*

UFC: Unité Formant Colonie

Table des figures

N°	Titre	Page
01	Formule générale des glucosinolates	7
02	<i>Malva sylvestris</i>	10
03	Les parties aériennes de <i>Malva sylvestris</i> (A : la feuille, B : les fleurs, C : le polyakène (schizocarpe)	11
04	Classification botanique de <i>M. sylvestris</i>	11
05	Structure de quelques constituants chimiques de la mauve sylvestre.....	14
06	Différentes activités biologiques la mauve sylvestre.....	14
07	La catégorisation clinique en fonction des CMI et des diamètres d'inhibitions.....	19
08	Observation microscopique d' <i>Escherichia coli</i>	20
09	Observation microscopique du <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
10	<i>Staphylococcus aureus</i> (A : Colonie <i>S. aureus</i> , B : les amas de <i>S. aureus</i> après Coloration de Gram	21
11	<i>Aspergillus niger</i> (A : aspect microscopique et B : aspect des colonies après une culture de 7 jours sur une gélose au malt 25°).....	22
12	Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de <i>M. sylvestris</i>	35
13	Activité antimicrobienne (CMI) des fractions acétone, hexane, méthanol et aqueux de <i>M. sylvestris</i>	36
14	Concentration minimale inhibitrice des extraits méthanoliques de <i>M. sylvestris</i>	37

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01:	Structure des principaux flavonoïdes.....	9
02:	principaux constituants chimiques de la feuille et la fleur de <i>M.sylvestris</i>	13
03:	Nature de souches testées.....	26
04:	Principaux souches pathogènes testées.....	29
05:	Nature de souches testées	32
06:	Effet antimicrobien (ZI : Zones d'inhibition) des extraits méthanoliques de <i>M. sylvestris</i>	37
07 :	Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans les trois articles.....	38

Table des matières

Introduction générale	1
Partie I. Synthèse bibliographiques	3
Chapitre 1. Plantes médicinales, <i>Malva sylvestris</i>	4
1. Généralités sur les plantes médicinales.....	5
2. Phytothérapie	5
3. Métabolites des plantes médicinales.....	6
3.1. Métabolites primaires des plantes	6
3.2. Métabolites secondaires des plantes.....	6
3.2.1. Les Terpénoïdes et les huiles essentielles	6
3.2.2. Les glucosinolates	7
3.2.3. Les alcaloïdes.....	7
3.2.4. Les composés phénoliques	8
4. Présentation de la plante <i>Malva sylvestris</i>	10
4.1. Généralités	10
4.2. Aspect botanique de <i>Malva sylvestris</i>	10
4.3. Classification botanique de la plante.....	11
4.4. Nomenclature et appellation	12
4.5. Répartition géographique.....	12
4.6. Principaux constituants chimique.....	12
4.7. Activités biologiques de <i>Malva sylvestris</i>	14
• Activités antimicrobienne.....	14
4.8. Utilisation traditionnelle	14
4.9. Toxicité.....	16
Chapitre 2. Les infections microbiennes	17
1. Les infections microbiennes.....	18
1.1. Les agents antibactériens et antifongiques.....	18
1.2. Antibiogramme et CMI.....	19

2. Caractéristiques générales des souches microbiennes étudiées	20
2.1. Les souches bactériennes	20
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	19
2.1.2. <i>Proteus vulgaris</i>	20
2.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.5. <i>Streptococcus pyogenes</i>	21
2.2. Les souches fongiques	22
2.2.1. <i>Aspergillus niger</i>	22
2.2.2. <i>Candida albicans</i>	22
Partie II. Expérimentale: Traitement d'articles	23
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	24
Article 1 : Efficacité d'extraits de chloroforme, d'éthanol et aqueux de plantes médicinales, <i>Malva sylvestris</i> et <i>Malva neglecta</i> , sur certains contaminants bactériens et fongiques d'infections de plaies	25
Article 2 : Conteneur phénolique et activités antioxydants et antimicrobiennes d'extraits de feuilles de <i>Malva sylvestris</i> L., <i>Malva oxyloba</i> Boiss., <i>Malva parviflora</i> L. et <i>Malva aegyptia</i> L.	28
Article 3 : Bioactivité de <i>Malva sylvestris</i> L., une plante médicinale d'Iran	31
Chapitre 4 : Résultats et discussion	34
Conclusion et perspectives	39
Références Bibliographiques	41
Annexes	51

Introduction générale

Les maladies infectieuses demeurent une problématique pour une grande partie de la population mondiale si bien qu'il est estimé que près de 25 % des décès recensés dans le monde causés par des maladies infectieuses (**Fauci et Morens, 2012**).

Le phénomène de résistance microbienne est considéré comme le principal obstacle à la réussite d'un traitement contre les maladies infectieuses. L'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est un phénomène inquiétant (**Shorr, 2009**).

Donc il est urgent de développer des composés naturellement bioactifs comme alternatives aux quelques antibiotiques qui restent efficaces (**Han et al., 2016**). Pour cela il existe plusieurs espèces végétales qui se développent dans le monde entier et possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (**Iserin, 2001**).

Malva sylvestris est une plante médicinale de la pharmacopée algérienne et européenne, qui appartient à la famille des malvacées (**Llopis, 2017**). Elle est parmi les espèces les plus utilisées dans la médecine traditionnelle, se distingue par la variété de ses utilisations, sa consommation remontant à 3000 ans av. J.C. Dans la région de la Syrie, des études archéologiques ont montré l'existence des graines de la mauve sylvestre dans le calcul dentaire des fossiles humains. Les chercheurs ont conclu que la consommation de cette espèce est ancienne, à la fois en tant que plante comestible et en raison de ses propriétés médicinales possibles (**Henry et Piperno, 2008**). Actuellement, plusieurs activités biologiques ont été déterminées à partir d'extraits issus de cette espèce à savoir l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, immunomodulatrice et antifongique (**Flore, 2011**).

Cette étude vise à analyser trois articles sur l'activité antimicrobienne de quelques extraits polaire et apolaire de la partie aérienne de *Malva sylvestris*. Ce travail est organisé en deux grandes parties :

✓ la première partie est d'ordre théorique divisée en deux chapitres ; dont le premier comporte des données générales sur les plantes médicinales et les propriétés de *Malva sylvestris* et le deuxième chapitre est réservé pour l'étude de l'activité antimicrobienne.

✓ La deuxième partie est d'ordre expérimentale, suite aux conditions sanitaires à cause de la pandémie mondiale du Covid-19, cette partie est présentée sous forme d'une synthèse de trois articles, divisée en deux chapitres ; dont le premier comporte la méthodologie de travail et le deuxième comporte les résultats et discussion.

Finalement, la dernière partie consacrée pour une conclusion générale.

Partie I. Synthèse bibliographiques

Chapitre 1.
Plantes médicinales,
Malva sylvestris

1. Généralités sur les plantes médicinales

Depuis longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales occupent une place dans la médecine traditionnelle (**Ould El Hadj et al., 2003**). Plusieurs études démontrent que ces plantes sont considérées comme une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche des molécules bioactives (**Mohammedi, 2013**). Actuellement, les sciences modernes étudient massivement les propriétés antioxydantes parce qu'elle est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'Alzheimer (**Butterfield et Lauderback, 2002**), l'artériosclérose et le cancer (**Gardner, 1997**), aussi bien les propriétés antibactériennes et antifongiques comme les antifongiques d'origine végétales présentent un large spectre d'activités sur une gamme de flore fongique dont inclus les champignons toxigènes. Cependant en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicales puisque la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes (**Mohammedi, 2013**).

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capable de prévenir, soulager ou guérir des maladies, certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces (**Schauenberg et Paris, 2006**). Cependant, une plante médicinale peut être définie comme une drogue végétale (est une plante ou une partie de plante) utilisée soit à l'état desséchée ou à l'état frais (**Mohammedi, 2013**). Cette expression « drogue végétale ou drogue » désigne la matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments (**CANM, 2006**).

2. Phytothérapie

La phytothérapie c'est une branche de médecine qui repose sur l'utilisation de plantes entières ou une partie de la plante "partie active" avec des propriétés thérapeutiques. Ces plantes sont indiquées comme des "plantes médicinales" (**Mohammedi, 2013**).

Deux types de phytothérapie peuvent être distingués, d'une part, une pratique traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes empiriquement, d'autre part, « la pharmacognosie » une pratique basée sur les avancées et les preuves scientifiques qui recherchent des extractions actives des plantes et ses effets, une fois identifiés sont standardisés (**Daoudi et al., 2015**).

Les préparations peuvent être obtenues par différentes techniques : macération, décoction, infusion ou sous forme de teinture, poudre totale, extraits, ... (**Mohammedi, 2013**).

3. Métabolites des plantes médicinales

3.1. Métabolites primaires des plantes

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui peuvent être trouvées dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour garantir leur survie. , ils sont divisés en cinq grandes catégories : **glucides, lipides, acides aminés, acides nucléiques et des protéines (Diallo, 2005 ; Mohammedi, 2013).**

3.2. Métabolites secondaires des plantes

Contrairement aux métabolites primaire, Les métabolites secondaires sont des composés phytochimiques complexes qui ne participent pas au développement de la plante mais ils peuvent joue le rôle de défense **(Newman et Cragg, 2012).**

Actuellement, un grand nombre de ces composés sont considérer comme une source thérapeutique utilisée dans la médecine traditionnelle et moderne. Nous mentionnerons ci-dessous certains groupes de molécules biologiquement actives **(Mohammedi, 2013).**

3.2.1. Les Terpénoïdes et les huiles essentielles

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires où des molécules très volatiles qui donnant à la plantes une odeur caractéristique, ces molécules sont synthétisées à partir d'unités méthyl-2-buta-1,3-diène (isoprène) et où les réactions d'addition de ces unités conduisent à la formation de terpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs produits d'oxydation tel que les alcools, cétones, aldéhydes, éthers et esters terpéniques. L'ensemble de ces métabolites sont accumulés au sien des cellules sécrétrices **(Heinrich et al., 1983).**

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des plantes **(Cowan, 1999)**, appelées aussi « essences » sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques **(Iserin et al., 2007).**

Les huiles essentielles possèdent nombreuses activités biologiques, participe dans nombreuses préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, tel que le thymol et le carvacrol sont souvent utilisé comme agent antiseptiques, antibactériens et antifongiques **(El Kalamouni, 2010).**

Dans les domaines phytosanitaires et dans l'industrie agro-alimentaires (**Kaloustian et al., 2008**), les huiles essentielles ou leurs composés actifs pouvant également utilisées comme agent protecteur pour les champignons phytopathogènes et les microorganismes qui envahissant les denrées alimentaires. Les huiles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Aussi les huiles essentielles font l'objet dans la recherche de nouveaux produits anticancéreux naturels (**Bounihi, 2015**).

3.2.2. Les glucosinolates

Les glucosinolates sont constitués d'un résidu β -D-glucose et d'un résidu oxime sulfaté et d'une chaîne latérale de structure variable selon l'acide aminé dont elle dérive. Au cours de la mastication ou de la préparation culinaire, aboutit à la formation d'isothiocyanates (**Figure 1**). Les glucosinolates sont notamment rencontrés dans les Brassicaceae ou Crucifères (chou, navet, brocoli, radis, moutarde) et présents à des teneurs variables (**Bruneton, 1999 ; Basdevant et al., 2001**). Les glucosinolates sont stockés dans toutes les parties de la plante et libérés lors d'une attaque de phytophages (**Adarsh et al., 2009**).

Dans l'alimentation, les glucosinolates à forte dose sont toxiques et antinutritifs mais à faibles doses, leurs produits de dégradation ont des propriétés antifongiques, antibactériennes, anti-oxydantes, antimutagéniques et anticarcinogéniques (**Koike et al., 2000**).

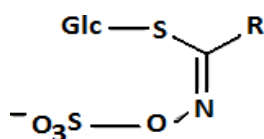


Figure 1 : Formule générale des glucosinolates (**Mohammedi, 2013**).

3.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine (**Guignard, 2000**). Comme ils peuvent provoquer chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques, à forte dose sont très toxiques. Ce sont des composés azotés naturels et dont le goût est amer (**Dellile, 2007**). Leur synthèse a lieu au niveau du

réticulum endoplasmique, puis se concentrent dans la vacuole. Les alcaloïdes issus du métabolisme des acides aminés sont des alcaloïdes vrais (**Guignard, 2000 ; Vollhardt et Schore, 2004; Bruneton, 2005**).

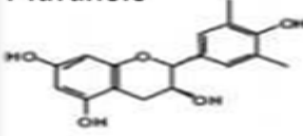
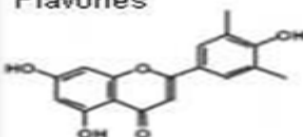
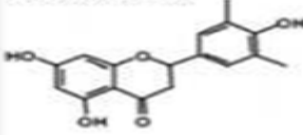
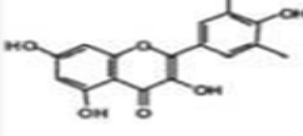
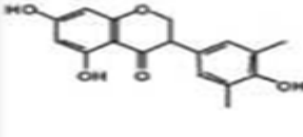
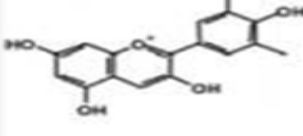
Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale (**Judd et al., 2002**). Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent d'être bénéfiques dans des traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements du corps humain. Les alcaloïdes sont utilisées comme anticancéreux, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin et al., 2007 ; Bounihi, 2015**).

Les pyrrolizidines, très répandues dans la nature, sont présents chez les plantes et font partie des familles botaniques Asteracée, Boraginaceae, Fabaceae et Orchidaceae (**Roeder, 1999**).

3.2.4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont l'un des groupes les plus importants chez les végétaux, issus de la grande voie d'aromagenèse, shikimates ou acide shikimique et de la voie acétate-malonate et peuvent être divisés en diverses classes en fonction de leur structure moléculaire et de plus de 8 000 composés différents ont été décrits (**Sahli, 2017**). Les plus abondants sont les acides phénols, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes, dont les flavonoïdes et les acides phénols comptent 60% et 30%, respectivement, de polyphénols diététiques. Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiées, et partagent un squelette carboné commun de diphenylpropanes (C6-C3-C6 c'est-à-dire deux noyaux benzènes jointifs par une chaîne linéaire de troiscarbone formant un hétérocycle oxygéné). Ces flavonoïdes peuvent être divisés en plusieurs classes selon leur structure moléculaire, les groupes principaux sont les flavanols, les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones et les anthocyanidines (**Bravo, 1998 ; Manach et al., 2005**) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : structures des principaux flavonoïdes (Ramos, 2007).

Flavonoïdes Classe	Flavonoïdes (exemples)
Flavanols 	EGCG Epigallocatechine Catéchine Epicatechine
Flavones 	Luteoline Apigénine Chrysin
Flavanones 	Naringénine Hesperidine Eriodictyol
Flavonols 	Quercétine Myricétine Kaempférol Rutine
Isoflavonoïdes 	Genistéine Daidzéine
Anthocyanidines 	Pelargonidine Cyanidine Malvidine

4. Présentation de la plante *Malva sylvestris*

4.1. Généralités

La Mauve, *Malva sylvestris* (**Figure 2**) appartient à la famille des Malvaceae (**Llopis, 2017**). Cette famille comporte environ 900 espèces, dont la plupart habitent les tropiques, mais elle envoie quelques représentants dans les zones tempérées, la plupart des Malvacées sont des plantes herbacées ou arbustes. Leurs grandes fleurs claires ont quelque chose de somptueux et doux ; elles brillent et n'ont pas de parfum (**Pelikan, 2003**), elles possèdent généralement un double calice plus grand et un peu renflé à l'intérieur, 5 pétales, étamines réunies en un faisceau, le fruit arrondi et plat ressemblant à un petit fromage (**Mc Clintock et Fitter, 1986**).



Figure 2 : *Malva sylvestris* (Llopis, 2017).

4.2. Aspect botanique de *Malva sylvestris*

La mauve sylvestre est une plante bisannuelle ou vivace (**Llopis, 2017**). Sa tige est forte, dressée, souvent rameuse pouvant atteindre jusqu'à 1 m de haut. Les feuilles (**Figure 3 : A**) arrondies à long pétiole, possèdent 3 à 7 lobes à bords dentés et une nervation palmée (**Salhi, 2018**). Les fleurs (**Figure 3 : B**) de Malvaceae sont de type 5 à filaments soudés sont pédicellés d'un rose violacée et possédant un calice et un calicule. Elle s'insère en petits bouquets à l'extrémité des rameaux (**Ghédira et Goetz, 2016**).

La formule florale est : $(5S) + 5P + nE + nC$. Le fruit est un polyakène (schizocarpe) (**Figure 3:C**) composé de méricarpes, entouré d'un calice marcescent (**Salhi, 2018**).

La floraison entre le mois juin et le mois d'octobre (Llopis, 2017).

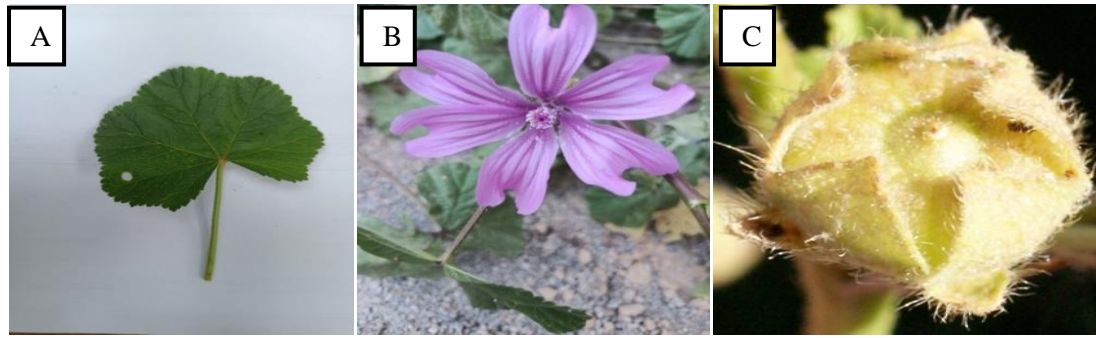


Figure 3: Les parties aériennes de *Malva sylvestris* (A : la feuille, B: les fleurs, C: le polyakène (schizocarpe) (Salhi, 2018).

4.3. Classification botanique de la plante

Cette plante a été classée selon Ghédira et Goetz (2016) comme suit : (Figure 4)

Règne : Plantae (Plantes)
Super division : Embryophyta (Embryophytes)
Division : Tracheophyta (Tracheophytes)
Subdivision : Spermatophytina (Spermatophytes)
Classe : Magnoliopsida
Super ordre : Rosanae
Ordre : Malvales
Famille : Malvaceae
Genre : Malva
Espèce : <i>Malva sylvestris</i>

Figure 4 : classification botanique de *M.sylvestris* (Ghédira et Goetz, 2016).

4.4. Nomenclature et appellation

Les noms communs de *Malva sylvestris* (Ghédira et Goetz, 2016).

- ✓ **Nom Français :** Mauve des bois, Grande Mauve, mauve sauvage, fromageon
- ✓ **Nom Anglais :** Bleu Mallow, High Mallow
- ✓ **Nom Arabe :** El khoubeiza (الخبيزة)
- ✓ **Nom scientifique :** *Malva sylvestris*

4.5. Répartition géographique

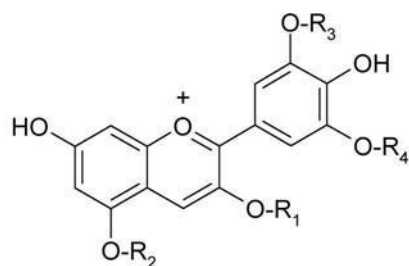
La mauve sylvestre ou la mauve sauvage est une plante originaire d'Europe, Asie occidentale et Afrique, elle se rencontre à l'état subspontané dans la plupart des pays tempérés du globe terrestre (Flores, 2011). C'est une plante très commune partout ; bords des champs, remblais, talus (Schauenberg et Paris, 2006).

4.6. Principaux constituants chimique

Les principaux constituants de la partie aérienne (feuilles et fleurs) de la mauve sylvestre sont présentés dans le tableau et la figure ci-dessous (Tableau 2) (Figure 5).

Tableau 2: principaux constituants chimiques de la feuille et la fleur de *M. sylvestris*

Feuilles	Fleurs
<p>Familles chimiques</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Mucilages (5 à 12 %) (Salhi, 2018). fournissant par l'hydrolyse de l'arabinose, du glucose, du rhamnose, du galactose de l'acide galacturonique. ✓ Flavonoïdes (Salhi, 2018). 8-O-glucuronides de l'hypolaetine, isoscutellaréine, 3-O-glucoside de gossypétols ✓ Monoterpènes, diterpènes, sesquiterpènes et nor-terpènes (Cutillo et al., 2006). ✓ Dérivé phénoliques (386,5mg/g) (Cutillo et al., 2006). <ul style="list-style-type: none"> • Acides 4-hydroxybenzoïque, 4-méthoxybenzoïque, 4-hydroxydihydrocinnamique, férulique. • Tyrosol. ✓ Acides organiques (Terninko et Onishchenko, 2013). Acides Oxalique, Malonique, Fumarique, succinique, benzoïque, glutarique, phenylacétique. ✓ Divers <ul style="list-style-type: none"> • Coumarines (Scopolétine) (Tosi et al., 1995). • Malvone et tanins (Veshkurova et al, 2006 ; Tabaraki et al., 2012). 	<p>Familles chimiques</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Mucilages (5 à 10 %) (Salhi, 2018). fournissant par l'hydrolyse du galactose, le rhamnose, les acides glucuroniques et galacturonique. Flavonoïdes (Bernard et al., 2003). Génistéine, myricétine, dérivé de l'apigénine, la quercétine et du kaempférol ✓ Anthocyanosides (Salhi, 2018). Malvine, 6-malocynmalvine, delphinidine ✓ Divers (Salhi, 2018). Coumarines et tanins (état de traces)



	R1	R2	R3	R4
Malvidine	H	H	CH ₃	CH ₃
Delphinidine	H	H	H	H
Malvine	Glc	Glc	CH ₃	CH ₃
Oenine	Glc	H	CH ₃	CH ₃

Figure 5: structure de quelques constituants chimiques de la mauve sylvestre

(Ghédira et Goetz, 2016).

4.7. Activités biologiques de *Malva sylvestris*

La mauve sylvestre est une plante médicinale importante qui présente un large spectre d'activités biologiques. Cette plante présente une activité antioxydante, anti inflammatoire, anticancéreuse, activité cicatrisante des plaies, activité hépatoprotectrice, activités antinociceptive et antimicrobiennes (Figure 6) (Dipak, 2016).



Figure 6: Différentes activités biologiques la mauve sylvestre (Dipak, 2016).

- **Activités antimicrobiennes**

La mauve sylvestre présente un large spectre d'activité vis-à-vis plusieurs souches bactériennes et fongiques (Dipak, 2016). Dulger et Gonuz (2004) ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de fleurs et de feuilles de *M. sylvestris* est actif contre neuf espèces bactériennes (*E.coli*, *S.aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *P.vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*) et trois levures (*C.albicans*, *Rhodotorula ruba*, *Kluyveromyces fragilis*).

Souza et al., (2004) ont également testé l'activité antimicrobienne de l'extrait de la partie aérienne de *M. sylvestris* contre (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *M. luteus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *C. albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*). Leur étude a rapporté que les extraits éthanoliques de *M. sylvestris* étaient actifs contre *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, et *E. coli*, mais l'extrait méthanolique n'a montré une activité que contre *S. cerevisiae*.

4.8. Utilisation traditionnelle

La mauve est l'une des plantes médicinales les plus importantes (**Dipak, 2016**), il était utilisée depuis l'antiquité dans plusieurs pays comme légume et remède elle était nommée en Italie « omnimorbia » signifiant « remède à toute maladie » cette plante est un symbole de la douceur (**Llopis, 2017**).

Au Maghreb, cette plante est toujours utilisée en cuisine .En Espagne, il est dit que : « un jardin potager et de la mauve constituent des remèdes suffisantes pour un foyer ».La mauve sylvestre elle est considéré comme un remède universel, elle soigne pratiquement toutes les maladies, les habitants de l'Aragon disent que « si tu ne guéris pas avec l'eau de mauve, jamais tu ne guériras ». L'eau de la mauve est utilisée comme rafraichissant pour enlever la soif ainsi il est utilisé pour traiter les hémorroïdes dans l'Estadilla (province de Huesca). La population de Selgua (province de Huesca) utilise la décoction de feuilles afin de soulagé des maux de tête et la décoction de racines pour calmé les douleurs dentaires (**Llopis, 2017**).

La mauve est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter la constipation du fait sa richesse en mucilage. Sa feuille possède des propriétés hypoglycémiantes. Traditionnellement, les fleurs et les feuilles sont utilisée pour calmer les douleurs abdominales d'origine digestive, les toux bénignes ou encore les maux de la gorge (**Llopis, 2017**). La drogue peut être également utilisée en cataplasme dans le traitement des plaies (**Salhi, 2018**).

La mauve possède aussi des propriétés anti-inflammatoires, antiprurigineuse, veinoprotectrice, antitussive et expectorante. La feuille et la fleur de la mauve sont inscrites à la 9ème édition de la pharmacopée européenne (**Llopis, 2017**).

Autres utilisations de la mauve

- ✓ Elle peut être utilisée comme colorant alimentaire grâce à la présence d'anthocyanosides (**Salhi, 2018**).

- ✓ La présence des propriétés adoucissantes, rafraichissantes, astringentes et anti-couperose dans les fleurs et les feuilles qui lui permettent d'être utilisable en cosmétologie (**Llopis, 2017**).

4.9. Toxicité

Plusieurs études montrent qu'aucune toxicité n'a été trouvée à la dose recommandée (**Conforti et al., 2008 ; Bussmanna et al., 2011**).

Chapitre 2. Les infections microbiennes

1. Les infections microbiennes

Ces dernières années, de nouveaux changements dans les maladies infectieuses ont lieu dans le monde entier. Les maladies infectieuses sont un type de maladie causée par des micro-organismes pathogènes tels que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons, qui peuvent se propager entre les humains et les animaux ou se transmettre des animaux aux humains (Yu et al., 2019).

Malgré les progrès scientifiques et technologiques qui laissaient croire à une possible éradication de nombreuses pathologies grâce à la généralisation des mesures d'hygiène et à l'utilisation des antibiotiques et des vaccins, la résurgence des maladies infectieuses et des parasitoses, et l'émergence régulière de nouveaux agents infectieux ont démenti ce pronostic optimiste posant également d'énormes problèmes de santé publique (Iwu et al., 1999).

Elles sont la cause principale des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues au monde. De nombreux antibiotiques sont développés pour y faire face, mais leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition des souches multi résistantes (Benabdellah et al., 2019).

1.1. Les agents antibactériens et antifongiques

Les agents antimicrobiens sont des substances qui ont la capacité d'inhiber la croissance (action germestatique) ou tuent les germes pathogènes mais pas nécessairement les endospores (action germicide). Il existe différentes classes d'agents antimicrobiens : Classe des agents chimiques (oxydants, alcools, aldéhydes et gaz), physiques (température et rayonnement) et chimiothérapeutiques (antibiotiques).

Les antibiotiques sont des molécules chimiques naturelle (produite par des micro-organismes tel que les moisissures : *Penicillium* et *Aspergillus* ou les bactéries : des genres de *Streptomyces* et *Bacillus*), semi-synthétique ou entièrement synthétique (Nauciel et Vildé, 2000) capables de tuer les micro-organismes sensibles « action bactéricides» ou d'inhiber leur croissance « action bactériostatiques». Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Toure, 2014).

1.2. Antibiogramme et CMI

L'antibiogramme est l'un des méthodes les plus anciennes, sert à tester la sensibilité du germe vers un antibiotique et reste la méthode la plus utilisées dans les laboratoires de routine (Matuschek *et al.*, 2014). Son principe repose sur la mise en contact in vitro de la bactérie à tester avec l'antibiotique et sur l'observation des conséquences sur la croissance et la survie bactérienne (Tasse, 2017).

Deux types de valeur sont recherchés:

- ✓ la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour les méthodes en milieu liquide, correspondant à la plus petite concentration d'antibiotique inhibant toute croissance visible de la bactérie à 18 h.
- ✓ le diamètre de la zone d'inhibition pour les méthodes en milieu gélosé (Tasse, 2017).

Ce diamètre est directement relié à la sensibilité du germe testé et à la bonne diffusion de l'antibiotique dans la gélose (Morel, 2017)

La catégorisation clinique d'une souche bactérienne en sensible, intermédiaire, ou résistante d'un antibiotique (Sirot *et al.*, 1996), permet de prédire le succès ou l'échec clinique du traitement antibiotique, les CMI ou les diamètres d'inhibition sont comparés à des valeurs critiques (concentrations critiques ou diamètres critiques) qui sont définis par les comités d'experts nationaux ou internationaux tels que le CASFM (Français) ou l'EUCAST (Européen) (Figure 7).

Les souches sont classées en 3 catégories :

- ✓ **sensible** si sa CMI est inférieur ou égale à la concentration critique inférieure (c), ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique supérieur (D),
- ✓ **résistante** si sa CMI est supérieur à la concentration critique supérieure (C), ce qui équivaut à un diamètre inférieur ou égal au diamètre critique inférieur (d),
- ✓ **intermédiaire** si sa CMI est comprise entre c et C, ce qui équivaut à un diamètre compris entre d et D (Tasse, 2017).

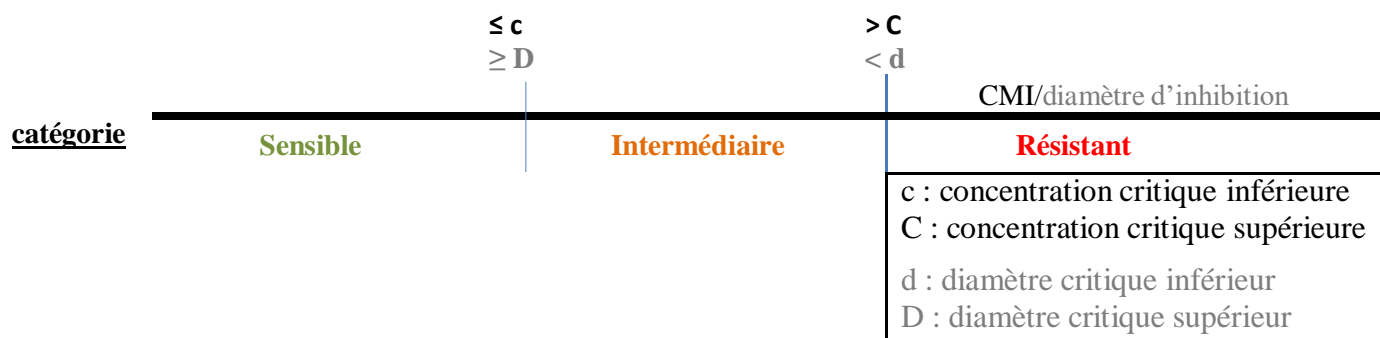


Figure 7 : la catégorisation clinique en fonction des CMI et des diamètres d'inhibitions (Tasse, 2017)

2. Caractéristiques générales des souches microbiennes étudiées

2.1. Les souches bactériennes

2.1.1. *Escherichia coli*

C'est un bacille à gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae, asporulé. immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche (**Figure 8**). Les bactéries se développent sur gélose Mac Conkey .Elles peuvent croître dans des conditions aérobies ou anaérobies (**Farmer et al., 2007**).

L'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, la majeure partie de la flore commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (**Tenaillon et al., 2010**).

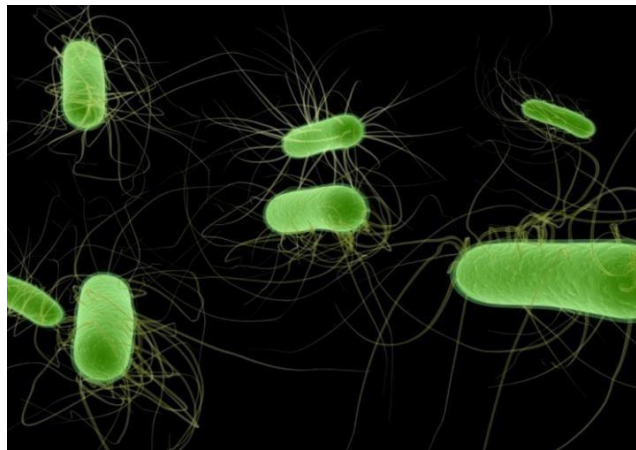


Figure 8 : Observation microscopique d'*Escherichia coli* (**Touhami, 2017**).

2.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif (**You Essoh, 2013 ; Touhami, 2017**). (**Figure 9**) non spoulé, aérobic strict (**You Essoh, 2013**), très mobile grâce à la présence des flagelles polaire (ciliature monotriche),non capsulé (**Touhami, 2017**) .Sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C . Les cultures de ce genre se caractérisent par le dégagement d'une odeur spécifique et la production des pigments de pyocyanine et de pyoverdine (**You Essoh, 2013**).

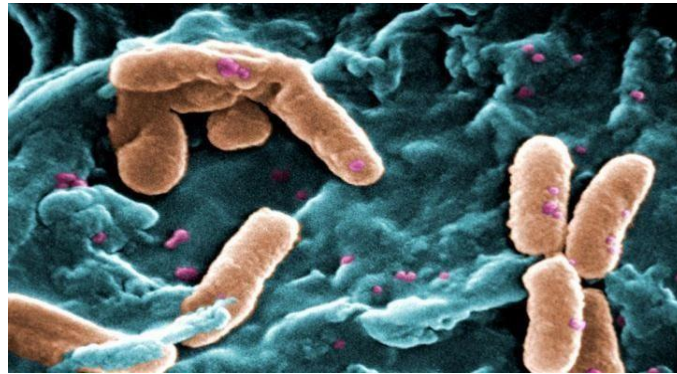


Figure 9 : Observation microscopique du *Pseudomonas aeruginosa* (Touhami, 2017).

2.1.3. *Staphylococcus aureus*

Ce sont des coques à Gram positif (**Figure 10:B**), non capsulée, très résistante dans le milieu extérieur et peu exigeante dans le milieu de culture. Le *S. aureus* est un germe ubiquitaire et commensal présent en faible quantité dans le tube digestif au niveau de la fosse nasale d'individus sains. La plupart des souches de *S. aureus* élaborent un pigment qui confère une couleur doré aux colonies, d'où l'origine du nom staphylocoque doré (**Figure 10: A**) (Davido, 2010).

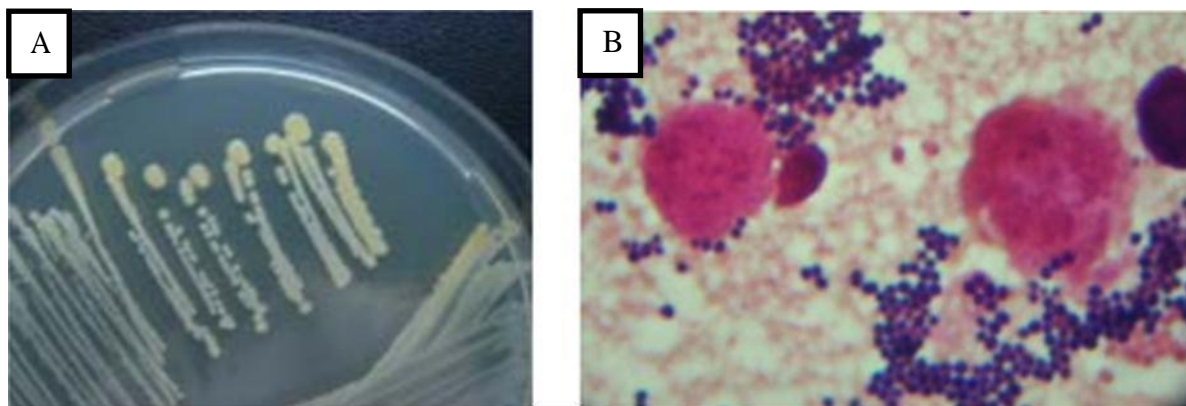


Figure 10: *Staphylococcus aureus* (A : Colonie *S. aureus*, B : les amas de *S. aureus* après Coloration de Gram) (Davido, 2010)

2.1.4. *Streptococcus pyogenes*

L'espèce *Streptococcus pyogenes* appartient à la famille des streptococcaceae qui regroupe les espèces commensales ou pathogènes de l'homme et les animaux. Ce sont des cocci à Gram positif regroupés en diplocoques ou en chainettes, asporulé, aéro-anaérobie facultatif, catalase négatif, non capsulés. La culture des streptocoques sur une gélose au sang et l'utilisation d'immuns sérums de lapin par Rebecca Lancefield permet de distinguer le groupe des pyogènes qui contient les streptocoques bêta hémolytiques et appartenant aux groupes sérologiques de Lancifield (A,B,C,G). Les colonies de *S. pyogenes* après 18 heures d'incubation sur une gélose au sang apparaissent sphériques, bombés, transparentes ou translucides avec un contour bien limité (Plainvert, 2013).

2.2. Les souches fongiques

2.2.1. *Aspergillus niger*

C'est un champignon microscopique, sa croissance est rapide de 2 à 3 jours sur les milieux de culture classiques dont la température optimale de croissance est de 25°C à 30°C mais il peut se développer jusqu'à 42°C (Tabuc, 2007).

Les colonies d'*Aspergillus niger* se présentent avec une surface granuleuse et un mycélium de couleur blanche au début puis jaune, elles deviennent noires à maturité et un revers généralement incolore sur le milieu Czapek (Figure 11) (Tabuc, 2007).

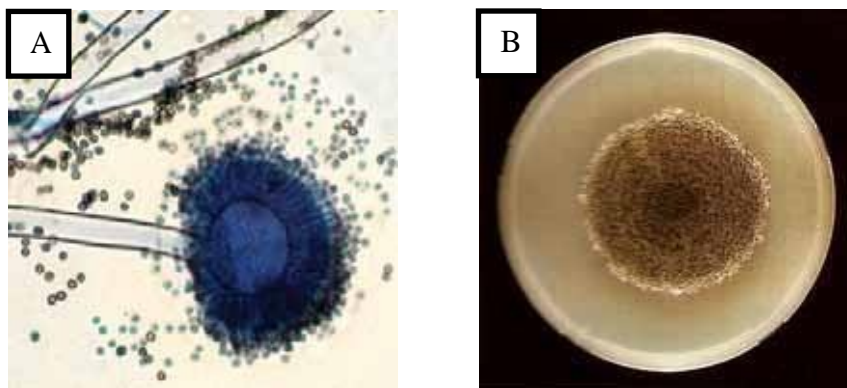


Figure 11 : *Aspergillus niger* (**A:** aspect microscopique et **B :** aspect des colonies après une culture de 7 jours sur une gélose au malt à 25°C) (Tabuc, 2007).

2.2.2. *Candida albicans*

La levure *C. albicans* est un champignon microscopique unicellulaire, pathogène, opportuniste, non capsulée, non pigmentée et aérobie (Chu et al., 1993 ; Pfaller et Diekema, 2007), se multiplie par bourgeonnement, il se trouve en quantité relativement limitée à l'état normale de l'organisme humain mais il peut provoquer des graves pathologies (Pfaller et Diekema, 2007), elle pousse sous forme de levure à 30 ° C et sous forme filamenteuse ou hyphale à 37 ° C sur la couche cornée de la peau, *C. albicans* existe sous forme de levures en herbe, le *C. albicans* pathogène dans le derme et les organes systémiques existe principalement sous forme de pseudo-hyphes (Gow et al., 2012).

Partie II. Expérimentale :

Traitement d'articles

Chapitre 3 :

Matériel et méthodes

Short Communication

Efficacy of chloroform, ethanol and water extracts of medicinal plants, *Malva sylvestris* and *Malva neglecta* on some bacterial and fungal contaminants of wound infections

Payman Zare^{1*}, Razzagh Mahmoudi², Sina Shadfar³, Ali Ehsani⁴, Yasaman Afraze¹, Anoosha Saeedan¹, Farzad Niyazpour⁵, and Babak Seyed Pourmand⁶

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

²Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³Young Researchers Club, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

⁴Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran.

⁵Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

⁶DVM, Large Animal Clinic Private Practitioner, Tabriz, Iran.

Accepted 7 May, 2012

In this study, the efficacy of chloroform, ethanol and water extracts of *Malva neglecta* and *Malva sylvestris* on some bacterial and fungal contaminants of wound infections were investigated. The results showed an acceptable efficacy of chloroform, water and ethanol extracts of these medicinal plants (*M. neglecta* and *M. sylvestris*) on some bacterial and fungal contaminants of wound infections. Among all obtained extracts, ethanol extracts of both species especially that of *M. sylvestris*, showed the best activity against bacteria, followed by aqueous extracts. The best of antibacterial minimum inhibitory concentration (MIC) values was 0.4 mg/ml obtained with *Streptococcus pyogenes* cultures. All extracts were active against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus vulgaris*. Aqueous and chloroform extracts had better antifungal activity. The best of antifungal MIC values was 0.6 mg/ml for *M. sylvestris* aqueous extract against *Aspergillus niger* cultures. All extracts had activity against *A. niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. Our results showed that all extracts are active against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *P. vulgaris* which have been reported to be troublesome bacteria in wound infections, especially in the aspect of antibiotic resistance as multi-resistant microorganisms. The ethanol extracts had the highest antibacterial activity than all other solvents. Anthocyanin of *M. neglecta* has approved bacteriostatic activity. This water soluble pigment can be responsible for acceptable antibacterial effects of aqueous extracts of this plant. Our results add more reasons to the clinical application of these extracts in the prophylaxis and treatment of wound infections. The wide range of the efficacy of these extracts: *A. niger*, *A. fumigatus* and *C. albicans* on different bacterial and fungal agents, and the healing acceleration obtained by these extracts makes them acceptable candidates for the promotion of healing in wound infections.

Key words: *Malva sylvestris*, *Malva neglecta*, extracts, contamination, antimicrobial agent.

INTRODUCTION

So many efforts have been made to discover new

antimicrobial compounds from various kinds of sources such as micro-organisms, animals, and plants. One of such resources is folk medicines (Burt, 2004). Systematic screening of them may result in the discovery of novel effective compounds. The increasing prevalence of multidrug resistant strains of bacteria and the recent

*Corresponding author. E-mail: pzare@tabrizu.ac.ir. Tel: +984113392374. Fax: +984113357834.

1. Le titre de l'article 01 :

Efficacité des extraits chloroformiques, éthanoliques et aqueux des plantes médicinales, *Malva sylvestris* et *Malva neglecta*, vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques responsables des infections de plaies.

2. Problématique

La mauve sylvestre est l'une des espèces des plantes médicinales les plus recherchées en raison de ses propriétés bactéricides, bactériostatiques, antifongiques et immuno-modulatrices de différents extraits de *Malva sylvestris*. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité des extraits apolaires (chloroforme), polaire (éthanol et aqueux) de *Malva sylvestris* et *Malva neglecta* sur certaines espèces bactériennes et fongiques responsables des infections des plaies.

3. Matériel utilisées

3.1. Matériel végétal

Cette étude a été portée sur les parties aériennes totales fraîche et sauvage de *M. sylvestris* des zones montagneuses de l'Azerbaïdjan oriental, en Iran.

3.2. Matériel biologique

L'activité antimicrobienne des extraits étudiés a été testée sur 06 souches pathogènes (quatre souches bactériennes et deux souches fongiques) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Nature des souches testées.

souches bactériennes	souches fongiques
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +) <i>Streptococcus pyogenes</i> (Gram +) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram -) <i>Proteus vulgaris</i> (Gram -)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> .

4. Protocole suivie

4.1. Préparation des extraits

Séchage et broyage

La poudre obtenue provenant de toutes les parties aériennes de la plante *M. sylvestris*.

Extraction par la méthode de Soxhlet

Selon la méthode décrite par **Zare et al., (2012)**, les extractions sont faites à l'aide d'un montage Soxhlet :

- ✓ Utilisation de 250 ml d'éthanol et de chlorométhane comme solvant d'extraction.
- ✓ Filtration avec des filtres de 0,45mm de diamètre
- ✓ Séchage à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C
- ✓ La mise en suspension de diméthylsulfoxyde (DMO) pour obtenir une concentration de 2 mg/ml (**Barros et al., 2010**).
- ✓ L'herbe individuelle a été bouillie avec 200 ml d'eau distillés jusqu'à ce réduit à 100 ml
- ✓ Filtration d'extrait à travers un papier filtre

4.2. Détermination de la CMI

La détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits a été effectuée par la méthode de dilution selon les directives du NCCLS/NCLI (**NCCLS, 2002, 2003**).

- ✓ Différentes concentrations d'extraits ont été ajoutées à des cultures jeunes des microorganismes
- ✓ Incubation sur un agitateur à 35°C pendant (24- 48 heures)
- ✓ Evaluation par spectrophotométrie à 570 nm (**NCCLS, 2003; Magro et al., 2006**)
- ✓ Les valeurs du CMI et CMB sont enregistrées (**NCCLS, 2002**)

Research Article

Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Malva sylvestris* L., *Malva oxycloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L. Leaves Extract

Khalid A. Shadid ^{1,2}, Ashok K. Shakya ^{1,2}, Rajashri R. Naik ^{1,2}, Nidal Jaradat ³,
Husni S. Farah ^{2,4}, Naeem Shalan ^{1,2}, Nooman A. Khalaf ^{1,2} and Ghaleb A. Oriquat ^{2,4}

¹Faculty of Pharmacy, Al-Ahliyya Amman University, Amman, Jordan

²Pharmaceutical and Diagnostic Research Centre, Al-Ahliyya Amman University, Amman, Jordan

³Department of Pharmacy, An-Najah National University, P.O. Box 7, Nablus, State of Palestine

⁴Faculty of Allied Medical Sciences, Al-Ahliyya Amman University, Amman, Jordan

Correspondence should be addressed to Khalid A. Shadid; kshadid@ammanu.edu.jo

Received 22 September 2020; Revised 23 December 2020; Accepted 11 March 2021; Published 28 March 2021

Academic Editor: Ajaya Kumar Singh

Copyright © 2021 Khalid A. Shadid et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The plants brought by Arabs were of real therapeutic values. Ibn Al-Baitar, an Islamic scholar (pharmacist, botanist, and physician), in his encyclopedia wrote the detailed characterization of more than one thousand herbs describing their medicinal value, methods of preparation, and their route of administration. **Objectives.** The current investigation points towards the quantitative characterization of the phenolic contents among the four edible *Malva* plants species (*Malva sylvestris* L., *Malva oxycloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L.) and also towards assessing their antibacterial activity against one Gram-positive isolate (*Staphylococcus aureus*) and four Gram-negative strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, and *Proteus vulgaris*. It also aimed to evaluate the free radical scavenging activity of hexane, methanolic, aqueous, and acetone extracts of four *Malva* species. **Methods.** By utilizing the Folin-Ciocalteu procedure and gallic acid as a reference molecule, the phenolic contents were estimated. In addition, the broth microdilution method was used to evaluate four plants' 16 extracts, and the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method was utilized to assess the abovementioned extracts against oxidative stress. **Results.** The results showed that the methanolic extract of *M. oxycloba* has the highest contents of phenols (191.54 ± 2.84 mg of GAE/g) and has the best antioxidant capacity with an IC₅₀ value of 1.94 ± 1.84 μg/ml, which is very close to Trolox. Regarding the ferrous ion chelating activity of the extract, the methanolic extract of *M. sylvestris* exhibits appreciable activity with IC₅₀ values of 52.7 ± 1.8 μg/ml. In addition, the plant extract and acetone extract of *M. sylvestris* showed a strong antibacterial activity with an MIC value of 0.0078 mg/ml. **Conclusion.** The methanolic extract of *M. oxycloba* has a pharmacological potential as a valuable natural product that can be utilized as a main ingredient in the design and development of new therapeutic formulations. It exerts multiple inhibitory properties against oxidative stress and bacterial growth. As such, it is emerging as a promising therapeutic agent for the treatment of various neurodegenerative diseases and many types of human infectious diseases.

1. Introduction

The history of phytotherapy started with our ancestors, who had the knowledge of the herbs and knew that the consumption of certain kinds of herb resulted in the soothing effect of several types of diseases. Recently, herbal remedies have become a controversial issue all over the world as large numbers of herbals are utilized in large quantities in cosmetics, as food preservatives and as nutritional supplements

and as natural ingredient in large number of drugs in many of the pharmaceutical industries. In fact, people around the world are more moving towards or prefer the herbal medicines due to the belief that these phytotherapeutic products are natural and safer than synthetic medicines [1]. In recent years, the term oxidative stress has been gaining interest among many research scientists, and this has led to the development of numerous techniques in the prevention of diseases caused by the action of the harmful free radicals that

1. Le titre de l'article 02 :

La composition phénolique et des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de feuilles de *Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L. et *Malva aegyptia* L.

2. Problématique

L'objectif de ce travail est de caractériser quantitativement les composés phénoliques des quatre espèces de plantes comestibles *Malva* (*Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L. et *Malva aegyptia* L.) et également à évaluer leur activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et trois souches à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*, et *Proteus vulgaris*). Elle visait également à évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres des extraits hexane, méthanolique, aqueux et acétone de quatre espèces de *Malva*.

3. Matériel utilisées

3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des feuilles de *M. sylvestris* collectées en mars 2018 dans les plaines et les montagnes de Tulkarm dans la région de la Cisjordanie en Palestine.

3.2. Matériel biologique

L'activité antibactérienne des extraits étudiés a été testée sur 04 souches pathogènes (**Tableau 4**).

Tableau 4 : principaux souches pathogènes testés

souches bactérienne testés
<i>Escherichia coli</i> (ATCC-25922) (Gram -)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-25923) (Gram +)
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC-838) (Gram -)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-27853) (Gram -)

5. Protocole suivie

Préparation des extraits

Préparation de la plante

- a. Lavage des feuilles avec l'eau distillée
- b. Séchage à température ambiante (2 à 3 semaines)
- c. Broyage des parties séchées
- d. Conservation à sec jusqu'à l'utilisation

Extraction par macération

- e. Les échantillons sont placés successivement dans 500ml d'eau distillée et dans n-hexane, acétate d'éthyle, méthanol dans un flacon fermé
- f. Agitation occasionnelle pendant 72 heures à température ambiante
- g. Filtration par un papier filtre whatman n°1
- h. Evaporation par un évaporateur rotatif à 35°C de tous les extraits sauf l'extrait aqueux qui a été lyophilisés
- i. Séchage et conservation des extraits à 4°C

Méthode de microdilution en milieu liquide (CMI)

La CMI à été déterminer par la méthode de microdilution en microplaque. 10µL de suspension bactérienne a été inoculé dans des puits contenant 100µL bouillon Muller Hinton. Ensuite, les extraits sont distribués dans chaque puits à différentes concentrations, des séries de dilutions 1/10 ont été effectuées.

La microplaque est couverte et incubée à 37°C pendant 24 h. La lecture se fait à l'œil nu sachant que la CMI est la plus faible concentration d'extrait testée, à la quelle aucun trouble visuel n'est observé.

Bioactivity of *Malva Sylvestris* L., a Medicinal Plant from Iran

*¹Seyed Mehdi Razavi, ²Gholamreza Zarrini, ¹Ghader Molavi, ³Ghader Ghasemi

Abstract

Objective(s)

Malva sylvestris L. (Malvaceae), an annual plant, has been already commonly used as a medicinal plant in Iran. In the present work, we evaluate some bioactivities of the plant extracts.

Materials and Methods

The aired-dried plant flowers and leaves were extracted by soxhlet apparatus with n-hexane, dichloromethane and methanol. The antimicrobial, cytotoxic, and phytotoxic of the plant extracts were evaluated using disk diffusion method, MTT, and Lettuce assays, respectively.

Results

Both flowers and leaves of *M. sylvestris* methanol extracts exhibited strong antibacterial effects against *Erwinia carotovora*, a plant pathogen, with MIC value of 128 and 256 µg/ml, respectively. The flowers extract also showed high antibacterial effects against some human pathogen bacteria strains such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, with MIC value of 192, 200 and 256 µg/ml, respectively. The plant methanol extracts had relatively high cytotoxic activity against MacCoy cell line.

Conclusion

We concluded that *Malva sylvestris* can be candidate as an antiseptic, a chemopreventive or a chemotherapeutic agent.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Cytotoxicity, *Malva sylvestris*

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

* Corresponding author. Tel: +98- 451- 5514702; Fax: +98- 451- 5514701; email: razavi694@gmail.com

2- Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Department of Statistics, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

1. Le titre d'article 03 :

Bioactivité de *Malva sylvestris* L., une plante médicinale d'Iran.

2. Problématique

La mauve sylvestre est une plante médicinale couramment utilisée en Iran. L'objectif de ce travail est l'évaluation de certaines activités biologiques des extraits de la plante.

3. Matériel utilisée

3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles et les fleurs de la plante *Malva sylvestris* récoltée durant le mois de Juin 2009 dans la région de Tabriz, en Iran.

3.2. Matériel biologique

L'activité antimicrobienne des extraits étudiés a été testée sur 04 souches pathogènes (2 souches bactériennes et 2 souches fongiques) (**Tableau 5**)

Tableau 5 : Nature des souches testées.

Souches bactériennes	Souches fongiques
<i>Escherichia coli</i> (PTCC 1047) <i>Staphylococcus aureus</i> (PTCC 1112)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053) <i>Aspergillus niger</i> (PLM 1140)

4. Protocole suivie

4.1. Préparation des extraits

Séchage du matériel végétal

Les feuilles et les fleurs sont séchées à l'aire

Extraction par la méthode de Soxhlet

Selon **Razavi et al., (2011)**, les extractions sont faites à l'aide d'un montage de type Soxhlet avec l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction

- ✓ Séchage des extraits sous vide

2.3. Détermination des activités biologique (activités antibactérienne et activités antifongiques)

Les activités antibactériennes antifongiques des extraits sont déterminées par la méthode de diffusion de disque. Ils sont utilisé milieu Muller- Hinton pour l'activité antibactérienne et milieu Sabouraud dextrose (SDA) pour l'activité antifongique. À partir de l'inoculum préparé, une suspension a été utilisée pour ensemercer des boîtes de Pétri par écouvillonnage (afin d'obtenir un tapis), après ils ont laissé les boîtes sécher pendant quelques minutes, un disque de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre imbibé avec 15 µL de solution mère d'extraits de plantes est déposé, deux disques d'antibiotiques (15µL d' érythromycine , 10µL de gentamicine) sont utilisés comme témoin positif pour les bactéries, un disque d'antifongique (10µL Amphotéricine B) a été utilisé comme témoin négatif pour les champignons .

Les boîtes sont laissées une heure à température ambiante pour permettre la diffusion de l'extrait, puis elles sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 h pour les champignons. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres à l'aide d'une règle, disque inclus (**Razavi et al ., 2009**)

Chapitre 4 :

Résultats et discussion

Etude de l'activité antimicrobienne

Le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de *Malva sylvestris*, a été évalué par différentes méthodes.

- **Méthode de dilution en bouillon**

Selon Zare *et al.*, (2012), un test de dilution en bouillon a été effectué pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de *Malva sylvestris*. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous

(Figure 12).

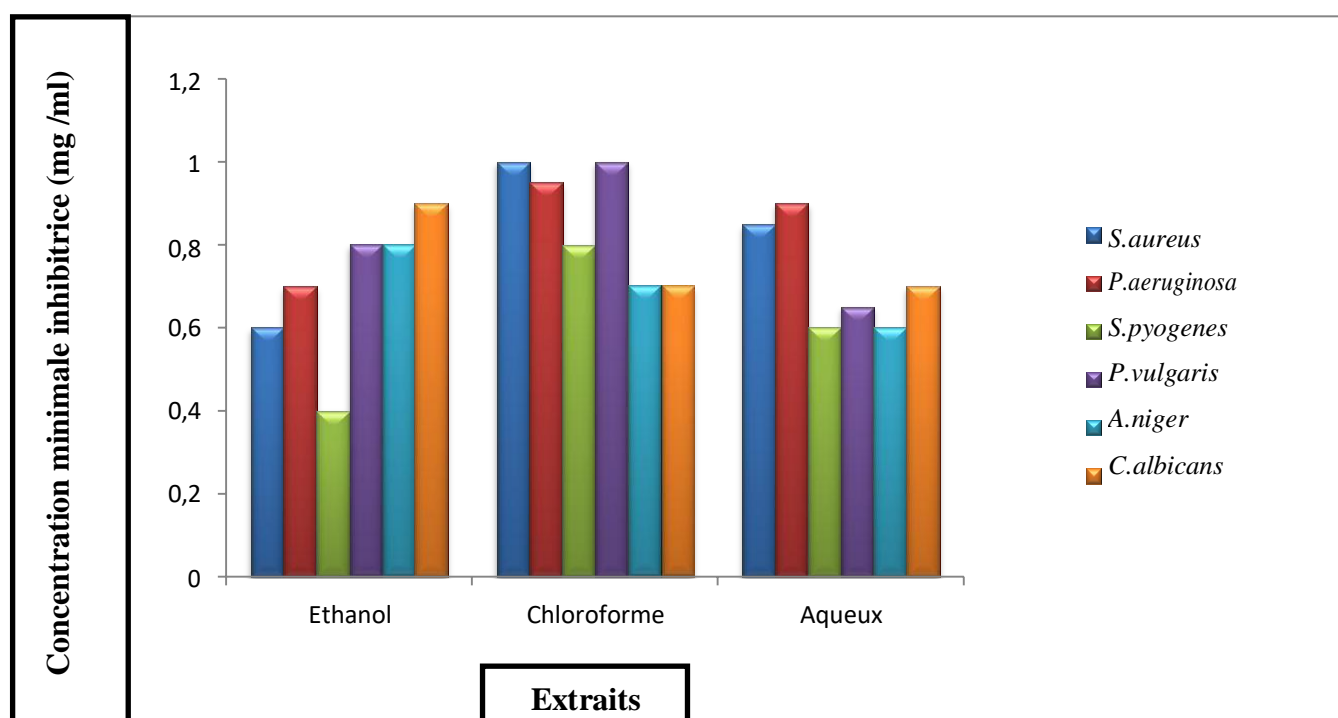


Figure 12 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de *M. sylvestris*

L'étude réalisée consiste à étudier et tester l'activité antimicrobienne de quelques extraits apolaire (chloroformique), et polaire (éthanolique, aqueux) de la partie aérienne de *M. sylvestris* obtenus par la méthode de Soxhlet.

Les résultats correspondent à l'activité antimicrobienne de différents extraits de *M. sylvestris* et qui montrent une efficacité variable. Cette dernière est en fonction de la nature du solvant et des molécules extraites.

Nous pouvons constater que l'extrait éthanolique a donné la meilleure inhibition vis-à-vis des souches bactériennes étudiées. Cependant, l'extrait aqueux et chloroformique montrent une bonne activité antifongique contre *A. niger* et *C. albicans* avec une CMI de 0,6 à 0,7 mg/ml. *Malva sylvestris* présente un large spectre d'activités vis-à-vis des souches microbiennes pathogènes.

- **Méthode de microdilution en milieu liquide (CMI)**

Selon **Shadid et al., (2021)**, La CMI a été déterminée par la méthode de microdilution en milieu liquide pour différentes souches microbiennes (**Tableau 4**). L'ensemble des résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 13**).

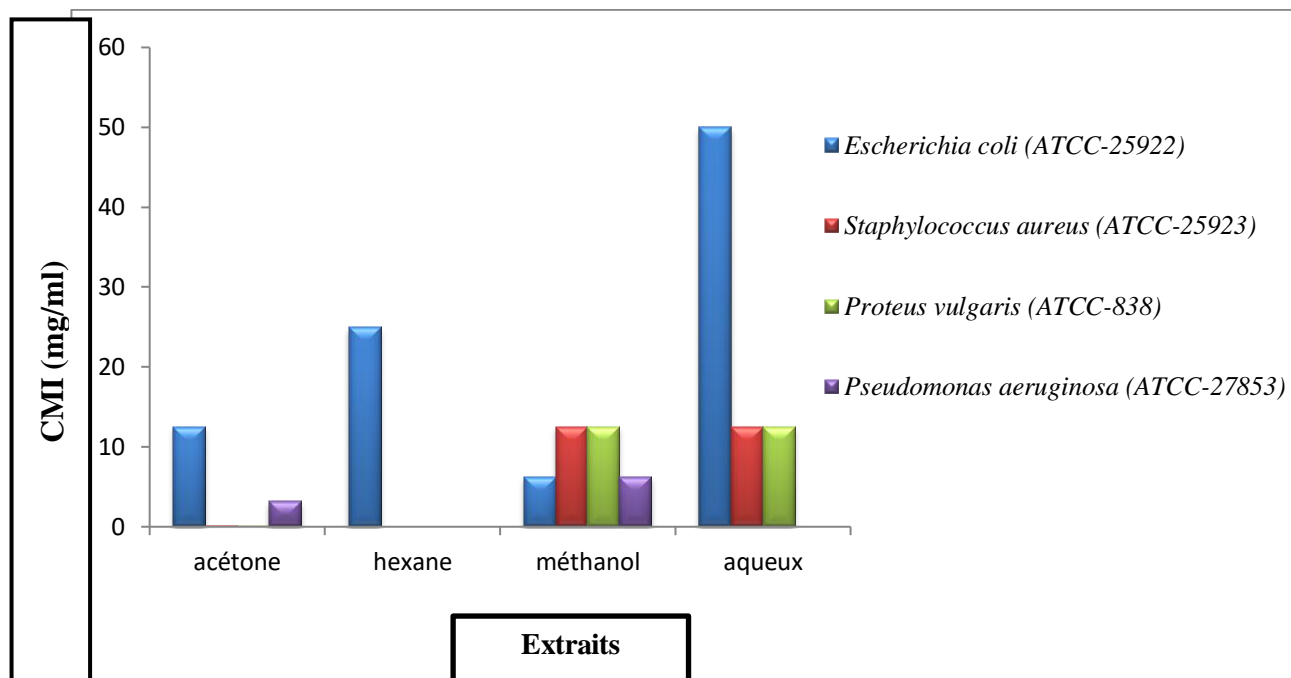


Figure 13 : Activité antimicrobienne (CMI) des fractions acétone, hexane, méthanol et l'eau de *M. sylvestris*

La CMI est un critère d'importance majeure. Elle est jugée comme étant la concentration la plus basse rapportée de l'extrait pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 24 heures d'incubation (aucun trouble n'est observé).

Les résultats après la lecture de microplaque montrent que l'extrait acétonique de *M. sylvestris* a donné la meilleure inhibition avec d'ordre de 0.078 mg/ml contre *Proteus vulgaris* (ATCC-838) suivi par l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, cependant l'extrait hexanique ne possède aucun effet antibactérien à l'exception de la souche *E. coli* (ATCC-25922) avec une concentration de 25mg/ml.

Il en ressort de cette analyse que chaque composé agit différemment sur les microorganismes.

La démonstration de l'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif peut être le signe de la présence d'un principe actif à large spectre et ça sera un grand avantage dans la lutte contre de nombreux agents pathogènes très fréquents ces derniers temps (**Doughari, 2006**).

- **Méthode de diffusion de disque**

Selon **Razavi et al., (2011)**, la détermination des activités biologiques (activité antibactérienne et antifongique) des extraits méthanoliques de la plante *Malva sylvestris* a été faite par la méthode de diffusion sur disque. L'ensemble des résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 14**) et (**Tableau 6**).

Tableau 6: Effet antimicrobien (ZI : Zones d'inhibition) des extraits méthanoliques

de *M. sylvestris*

Microorganismes	Extrait de feuille (1,5mg/ml)	Extrait de fleur (1,5mg/ml)	Erythromycine (0,03 mg)	Gentamicine (0,003 mg)	Amphotericine B (0,01mg)
<i>E. coli</i>	640	512	16	20	-
<i>S. aureus</i>	320	192	19	20	-
<i>C. albicans</i>	800	640	-	-	24
<i>A. niger</i>	950	800	-	-	23

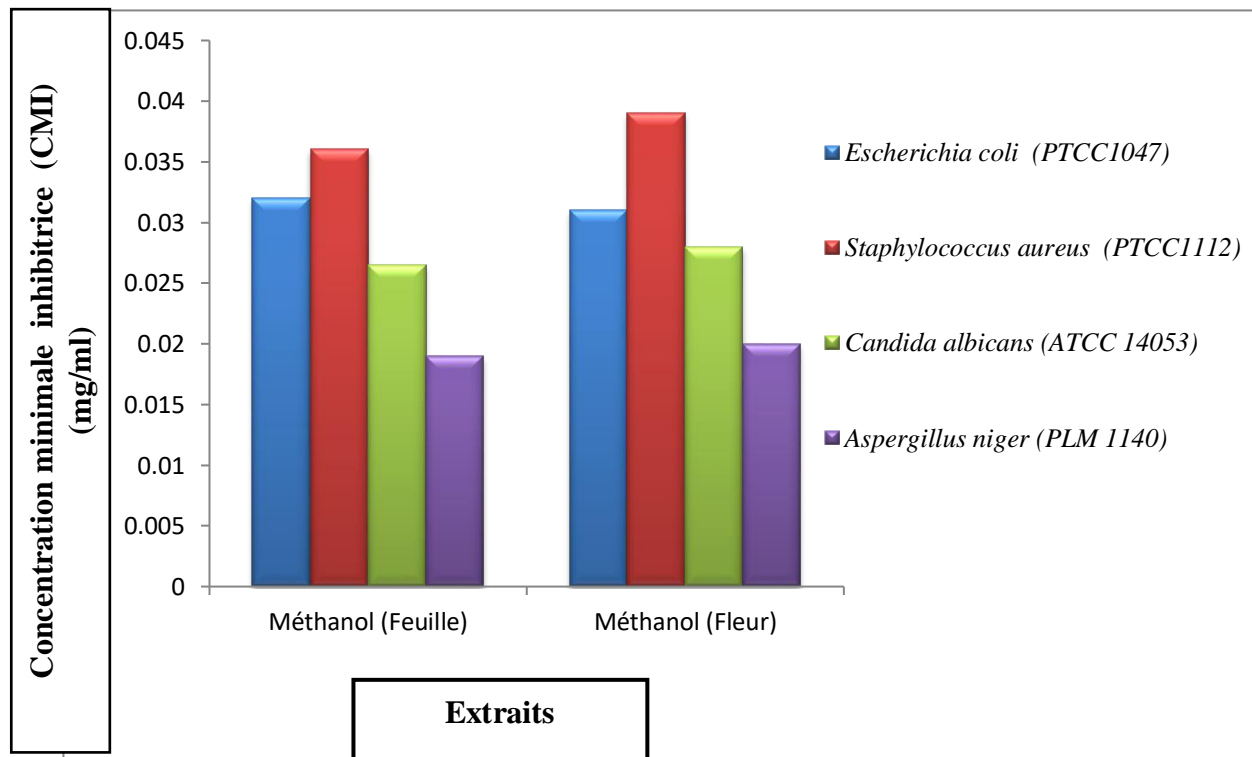


Figure 14 : concentration minimale inhibitrice des extraits méthanoliques de *M. sylvestris*

D'après cette étude, le criblage de l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'extrait méthanolique de *M. sylvestris* a été étudié par l'utilisation de la technique de diffusion sur gélose. L'extrait testé a montré un bon effet contre tous les agents pathogènes, en particulier *A. niger* et *E. coli*, les CMI obtenus sont de l'ordre 0,019 mg/ml et 0,031 mg/ml.

Ces informations ont confirmé que le méthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction des substances antimicrobiennes chez *M. sylvestris*. Une étude plus approfondie sera nécessaire sur la purification du principe actif de cet extrait, afin d'ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments potentiels pour traiter des infections bactériennes et fongiques opportunistes résistants.

- L'ensemble des résultats de différents tests sont exprimés ci-dessous (**Tableau 7**)

Tableau 07 : Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus dans les trois articles

	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i> (ATCC-25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC-25923)	<i>P. vulgaris</i> (ATCC-838)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC-27853)	<i>E. coli</i> (PTCC 1047)	<i>S. aureus</i> (PTCC 1112)	<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	<i>A. niger</i> (PLM 1140)
Ethanol	0,6	0,4	0,7	0,8	0,8	0,9								
Chloroforme	1	0,8	0,95	1	0,7	0,7								
Aqueux	0,85	0,6	0,9	0,65	0,6	0,7								
Acétone							12,5	0,125	0,078	3,125				
Hexane							25	-	-	-				
Méthanol							6,25	12,5	12,5	6,25				
Aqueux							50	12,5	12,5	-				
Méthanol (Feuille)											0,032	0,036	0,0265	0,019
Méthanol (Fleur)											0,031	0,039	0,028	0,02

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales constituent une source intéressante dans recherche des nouvelles molécules bioactives. *Malva sylvestris* appartient à la famille des Malvaceae; une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle pour leur propriétés thérapeutiques.

Cette étude vise à analyser trois articles sur l'activité antimicrobienne de quelques extraits (ethanolique, chloroformique, hexaniques , acétoniques, méthanolique , aqueux) de la partie aérienne de la plante de *Malva sylvestris* vis-à-vis des souches pathogènes : des espèces fongiques : *A. niger*, *C. albicans*, des bactéries à Gram positif: *S.aureus*, *S. pyogenes* et des bactéries à Gram négatif : *E.coli*, *P.aeruginosa*, *P.vulgaris* reconnus pour ces impacts cliniques, sanitaires et économiques. Cette activité a été testée par deux méthodes: diffusion sur milieu Muller Hinton Agar et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

L'extrait méthanolique des fleurs présente une bonne activité antibactérienne contre *E.coli* (PTCC 1047) avec une zone d'inhibition d'ordre de 512 mm et une CMI de 0,031 mg/ml suivie par l'extrait acétonique chez *P.vulgaris* (ATCC-838) avec une CMI de 0 ,078 mg/ml suivie par l'extrait éthanolique chez *S. pyogenes* avec une CMI d'ordre de 0,4mg /ml.

Tandis que, l'extrait hexanique ne possède aucun effet antibactérien contre *S. aureus* (ATCC-25923), *P .vulgaris* (ATCC-838), *P. aeruginosa* (ATCC-27853). Cependant, l'extrait méthanolique présente une forte activité antifongique contre les souches d'*A. niger* (PLM 1140) et les souches de *C. albicans* .

En perspective, Ces résultats ne constituent qu'une première étape dans la recherche de nouveaux composés naturels biologiquement actifs à proposer en médecine. De ce fait, une étude plus approfondie sera nécessaire sur la purification du principe actif de ces extrait, afin d'ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments potentiels pour traiter des infections microbiennes opportunistes résistantes.

Références bibliographiques

A

- Adarsh, P.V., Geetanjali, R., Tarunpreet Singh, T., Saroj, A. Bio-protective effects of glucosinolates. *Food science and technology*, 2009, Vol. 42, pp .1561-1572.

B

- Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, Vol. 48(6), pp. 1466-1472.
- Basdevant, A., Laville, M., Lerebours, E. *Traité de nutrition clinique de l'adulte*. Paris : Flammarion, 2001.
- Benabdellah, R., Frikha, D., Maalej, S., Sassi, S. Evaluation of the antibacterial and antifungal activities of Marine algae especes. *Jim Sfax*, 2019, Vol. 31, pp. 38-44.
- Bengtson, I.A. The Proteus group of organisms with special reference to agglutination and fermentation reactions and to classification. *Journal of Infectious Diseases*, 1919, Vol. 24(5), pp. 429-481.
- Bernard, M., Wichtl, M., Anton, R. *Plantes thérapeutiques :tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Paris: Tec& Doc, 2003, pp.689.
- Bounihi, A. Criblage phytochimique, Etude toxicologique et valorisation pharmacologique de *Melissa officinalis et Mentha rotundifolia* (Lamiacées). Th.doct :Médecine: Université de Mohammed V - Rebat, 2015, pp.26-30
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev*, 1998, Vol. 56, pp. 317–333.
- Bruneton J. *Pharmacognosie: phytochimie et plantes médicinales* (3^{ème} édn.), Tec et Doc Lavoisier, 1999, Paris.
- Bruneton, J. *Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux* (3^{ème} édn). Tec et Doc Lavoisier, 2005, Paris.
- Bussmanna, RW., Malca, G., Glenna, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol*, 2011, Vol. 137(121), pp. 40.

- Butterfield, D., Lauderback, C. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2002, Vol. 32, pp. 1050- 1060.

C

- CANM (Communiqué de l'Académie Nationale de Médecine), 6 décembre 2006.
- Chu, W.S., Magree, B.B., Magee, P.T. Construction of an sfilmacrorestriction map of the *Candida albicans* genome . *Journal of Bacteriology*, 1993, Vol .175, pp. 6637-6651.
- Conforti, F., Ioele, G., Statti, G. A ., Marrelli, M ., Rango, G., Menichini, F. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plant . *Food and chemical Toxicology*, 2008, Vol. 46(10), pp. 3325-3332.
- Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999. Vol. 12, pp. 564-582.
- Cutillo, F., Dabrosca, B., Dellagrecia, M ., Fiorentino, A ., Zarrelli, A .Terpenoids and phenol derivatives from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry*, 2006, Vol. 67(5), pp. 481-485.

D

- Daoudi, A., Bammou, M ., Zarkani , S., Slimani, I., Ibjibijen, J., Nassiri, L. Etude ethenobotanique de la flore médicinale dans la commune rurale d'Aguelmouss provincede Khénifra (Maroc) . *Phytothérapie*. 2015, Vol .14(4), pp. 220-228.
- Davido, B. Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré. Th. doct : Medecine: Université de Denis Diderot, 2010, p.14.
- Delille, L. Les plantes médicinales d'Algérie. Alger : BERTI, 2007, pp. 122.

- Diallo, A. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD (Myrtaceae). Th. doct : Pharmacie: Université de Bamako, 2005, pp.92.
- Dipak, P. A Review on biological activities of Common Mallow (*Malva sylvestris* L.), 2016, Vol. 4, pp.1-5.
- Doughari, J.H. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2006, Vol. 5(2), pp.597-603.
- Dulger, B., Gonuz, A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J Plant Sci*, 2004, Vol. 3(1), PP. 104- 107.

E

- El Kalamouni, C. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Th. doct : Sciences des Agroressources, Toulouse (France), 2010.

F

- Farmer III, J. J., Boatwright, K. D., Janda, J. M. *Manual of Clinical Microbiology* . 9^{ème} Edition. Edited by J. H. Jorgensen, 2007, pp. 649.
- Fauci, A. S., Morens, D. M. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. *New England Journal of Medicine*, 2012, Vol. 366(5), pp. 454-461.
- Flores, M. *Malva sylvestris* L. et autres mauve de France .Th. doct : Pharmacie: Université de Nantes, 2011, pp. 30, 77, 79, 80, 81.
- Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., de Hoff, P.L., Hirsch, A.M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, Vol. 56 (2), pp.195–206.

G

- Gardner, P. Superoxide-driven a conitase FE-S center cycling. *Bioscience Rep*, 1997, Vol. 17, pp. 33-42.
- Ghédira, K., Goetz, P. *Malva sylvestris* L (malvaceae) : Mauve. *Phytothérapie*, 2016, Vol.10, pp. 1- 4.
- Gow, N. A., Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J., Netea, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, Vol.10 (2), pp.112-122.
- Guignard, J. L. Biochimie végétale. 2ème édition. Paris : Dunod, 2000, pp. 198-207.

H

- Han, S.M., Kim, J.M., Hong, I.P., Woo, S.O., Kim, S . G ., Jang, H.R., Pak, S.C. Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Molecules*, 2016, Vol. 21(1), pp. 79.
- Heinrich, G., Schultze, W., Pfab, I., Boettger, M. The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*. *Physiologie Vegetale* .1983, Vol. 21, pp. 257- 268.
- Henry, A. G., Piperno, D. R. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqai, Syria. *J Archaeol*, 2008, Vol. 35 (7), pp. 1943-1950.

I

- Iserin, P. Encyclopédie des plantes médicinales. Paris: Larousse Bourdasse, 2001, pp. 100-335.
- Iserin, P., Masson, M., Restellini, J.P. La rousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed. Larousse, 2007, pp.14.
- Iwu, M.W., Duncan, A.R., Okunji, C.O. New Antimicrobials of Plant Origin. In: Perspectives on New Crops and New Uses, ASHS Press, 1999, Alexandria, pp. 457-462.

J

- **Judd Walter, S., Campbell Christopher, S., Kellogg Elizabeth, A., Stevens Peter.** Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université, 2002, pp.84- 87, 396-399

K

- **Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., Vergnes, M.F.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 2008, Vol. 6, pp.160-164.
- **Koike, S., Subbarao, K.V.** Broccoli residues can control *Verticillium* wilt of cauliflower. *California Agriculture*, 2000, Vol. 54(3), pp. 30-33.

L

- **Llopis, L.** Les plantes médicinales pyrénéennes et leur utilisation thérapeutiques dans les pathologies bénignes. Th. doct: pharmacie : Université de Bordeaux, 2017, pp.50-54 .

M

- **Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., Mexia, A.** Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 2006, Vol. 23(3), pp. 176-178.
- **Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, Vol. 81, pp. 230-242.
- **Matuschek, E., Brown, D.F.J., Kahlmeter, G.** Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, Vol. 20(4), pp. 255-266.
- **Mc clintock, D., Fitter, R.S.R.** Guide Des Plantes A Fleurs. 1986, pp.52.

- **Mohammedi, Z. Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Th. doct : Biologie : Université de Tlemcen, 2013, pp.20-22 .**
- **Morel, A.S. Fosfomycine et licomycine sur *Staphylococcus aureus et non aureus*.Th. doct : Pharmacie : Université de Marseille, 2017, pp.40.**

N

- **Nauciel, C. Vildé, J.L. Bactériologie Médicale. 2^{ième} édition. Paris : Masson, 2000.**
- **NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Approved standard M38-A*, NCCLS, Wayne, PA, 2002.**
- **NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of bacteria that grow aerobically; approved standard – sixth edition. *Document M7-A6*. NCCLS. Wayne PA, 2003.**
- **Newman, D.J., Cragg, G.M .Naturel Product As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal Of Natural Products*, 2012, Vol .75(3), pp.311-335.**

O

- **Ould El Hadj, M.D., Hadj-Mahammed, M., Zabeirou, H. Place of the spontaneous plants samples in the traditional pharmacopoeia of the area of Ouargla. *Courrier du savoir*, 2003, Vol . 3, pp. 47-51.**

P

- **Pelikan, W. L'homme et les Plantes Médicinales. Paris: Triades, 2003, pp.189-190.**
- **Pfaller , M.A., Diekema, D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent PublicHealth Problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, Vol .20(1), pp. 133-163.**
- **Plainvert, C. Etude de la biodiversité des souches de *Streptococcus pyogenes* responsables d'infections invasives et de cas groupé par une approche de génomique comparative. Th. doct : Microbiologie : Université de Paris Descartes, 2013 , pp .17-19 .**

R

- Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, Vol. 18, pp. 427-442.
- Razavi, S. M., Nejad-Ebrahimi, S. Chemical composition, allelopathic and cytotoxic effects of essential oils of flowering tops and leaves of *Crambe orientalis* L. from Iran. *Natural product research*, 2009, Vol. 23(16), pp. 1492-1498.
- Razavi, S. M., Zarrini, G., Molavi, G., Ghasemi, G. Bioactivity of *Malva sylvestris* L., a medicinal plant from Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2011, Vol. 14(6), pp. 574- 579.
- Roeder, E. Analysis of pyrrolizidine alkaloids. *Current Organic Chemistry*, 1999, Vol. 3(6), pp. 557-576.

S

- Sahli, R. Etude phytochimique de quelque plantes extremophiles Tunisiennes et exploration de leurs activites biologiques. Th. doct : Génie Biologique: Université de Lille 2, 2017, pp.8.
- Salhi, C. Les plantes antitussives à l'officine. Th. doct : pharmacie : Université de Grenoble Alpes – Grenoble, 2018, pp .45-47 .
- Schauenberg, P., Paris, F. Guide des plantes médicinales. Paris : Delachaux et Niestlé, 2006, pp.8 -61.
- Shadid, K. A., Shakya, A. K., Naik, R. R., Jaradat, N., Farah, H. S., Shalan, N., Khalaf, N.A. Oriquat, G. A. Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L. Leaves Extract. *Journal of Chemistry*, 2021, Vol. 2021, pp.1 - 10.
- Shorr, A.F. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on out comes in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, 2009, Vol. 37, pp. 1463–1471.

- Sirot, J., Courvalin, P., Soussy, C.J. Definition and determination of in vitro antibiotic susceptibility breakpoints for bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 1996, Vol. 2(1), pp. S5-S10.
- Souza, G., Haas, A., Von Poser, G., Schapoval, E., Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Ethnopharmacol*, 2004, Vol. 90 (1), pp.135-143.

T

- Tabaraki, R., Yosefi, Z., Gharneh, H.A.A . Chemical composition and antioxidant properties of *Malva sylvestris L.* *J Res Agr Sci*, 2012, Vol. 8, pp. 59-68.
- Tabuc, C. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Th. doct :Pathologie, Mycologie, Génétique et Nutrition:Institut National Polytechnique de Toulouse et de l'Université De Bucarest, 2007 , pp.30-41 .
- Tasse, J. Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections osteo-articulaires a *Staphylocoques*. Th. doct: Microbiologie: Université de Claude Bernard –Lyon 1, 2017, pp .68-70.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, Vol. 8(3), pp. 207-217.
- Terninko, II. Onishchenko, UE. Component composition of organic acids in leaves of *Malva sylvestris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2013, Vol. 49(2), pp.332-333.
- Tosi, B., Tirillini, B., Donini, A., Bruni, A. Presence of scopoletin in *Malva sylvestris*. *International Journal of Pharmacognosy*,1995, Vol. 33(4),pp.353-355.
- Touhami, A. Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différentes genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. Th. doct : Chimie Organique : Université de Badji Mokhtar – Annaba, 2017 , pp .45-47 .

- Toure, D. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de Quatre Plantes Aromatiques Medicinales De Coté D'ivoire. Th. doct : Chimie-Biologie : Université de Felix Houphouet -Boigny, 2014, pp .31-32 .

V

- Veshkurova, O., Golubenko, Z., Pshenichnov, E ., Arzanova, I ., Uzbekov, V., Sultanova, E., Puckhaber, L.S .Malvone A, a phytoalexin found in *Malva sylvestris* (family Malvaceae). *Phytochemistry*, 2006, Vol. 67(21), pp. 2376-2379.
- Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E. Traité de chimie organique .4^{ème} édition. Paris : De Boeck, 2004.

Y

- You Esson, C. Etude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. Th. doct : Science : Université de Paris-Sud , 2013, pp .15 .
- Yu, X., Jiang, W., Shi, Y., Ye, H., Lin, J., Application of sequencing technology in clinical microbial infection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, Vol. 23(11), pp. 7143-7150.

Z

- Zare, P., Mahmoudi, R., Shadfar, S., Ehsani, A., Afraze, Y., Saeedan, A., Niyazpour, F., Pourmand, B. S. Efficacy of chloroform, ethanol and water extracts of medicinal plants, *Malva sylvestris* and *Malva neglecta* on some bacterial and fungal contaminants of wound infections. *J Med Plants Res*, 2012, Vol. 6, pp. 4550-4552.

Annexes

Short Communication

Efficacy of chloroform, ethanol and water extracts of medicinal plants, *Malva sylvestris* and *Malva neglecta* on some bacterial and fungal contaminants of wound infections

Payman Zare^{1*}, Razzagh Mahmoudi², Sina Shadfar³, Ali Ehsani⁴, Yasaman Afraze¹, Anoosha Saeedan¹, Farzad Niyazpour⁵, and Babak Seyed Pourmand⁶

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

²Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³Young Researchers Club, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

⁴Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran.

⁵Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

⁶DVM, Large Animal Clinic Private Practitioner, Tabriz, Iran.

Accepted 7 May, 2012

In this study, the efficacy of chloroform, ethanol and water extracts of *Malva neglecta* and *Malva sylvestris* on some bacterial and fungal contaminants of wound infections were investigated. The results showed an acceptable efficacy of chloroform, water and ethanol extracts of these medicinal plants (*M. neglecta* and *M. sylvestris*) on some bacterial and fungal contaminants of wound infections. Among all obtained extracts, ethanol extracts of both species especially that of *M. sylvestris*, showed the best activity against bacteria, followed by aqueous extracts. The best of antibacterial minimum inhibitory concentration (MIC) values was 0.4 mg/ml obtained with *Streptococcus pyogenes* cultures. All extracts were active against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus vulgaris*. Aqueous and chloroform extracts had better antifungal activity. The best of antifungal MIC values was 0.6 mg/ml for *M. sylvestris* aqueous extract against *Aspergillus niger* cultures. All extracts had activity against *A. niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. Our results showed that all extracts are active against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *P. vulgaris* which have been reported to be troublesome bacteria in wound infections, especially in the aspect of antibiotic resistance as multi-resistant microorganisms. The ethanol extracts had the highest antibacterial activity than all other solvents. Anthocyanin of *M. neglecta* has approved bacteriostatic activity. This water soluble pigment can be responsible for acceptable antibacterial effects of aqueous extracts of this plant. Our results add more reasons to the clinical application of these extracts in the prophylaxis and treatment of wound infections. The wide range of the efficacy of these extracts: *A. niger*, *A. fumigatus* and *C. albicans* on different bacterial and fungal agents, and the healing acceleration obtained by these extracts makes them acceptable candidates for the promotion of healing in wound infections.

Key words: *Malva sylvestris*, *Malva neglecta*, extracts, contamination, antimicrobial agent.

INTRODUCTION

So many efforts have been made to discover new

antimicrobial compounds from various kinds of sources such as micro-organisms, animals, and plants. One of such resources is folk medicines (Burt, 2004). Systematic screening of them may result in the discovery of novel effective compounds. The increasing prevalence of multidrug resistant strains of bacteria and the recent

*Corresponding author. E-mail: pzare@tabrizu.ac.ir. Tel: +984113392374. Fax: +984113357834.

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of *M. sylvestris* extracts.

Extract	MIC (mg/ml)						
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>
Ethanol	0.60	0.70	0.40	0.80	0.80	1.00	0.90
Chloroform	1.00	0.95	0.80	1.00	0.70	0.90	0.70
Aqueous	0.85	0.90	0.60	0.65	0.60	0.85	0.70

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of *M. neglecta* extracts.

Extract	MIC (mg/ml)						
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>
Ethanol	0.70	0.60	0.60	0.75	0.80	1.00	0.95
Chloroform	0.95	1.00	0.95	1.20	0.80	1.00	0.95
Aqueous	0.90	0.90	0.90	0.90	0.70	0.95	0.90

appearance of strains with reduced susceptibility to antibiotics raises the specter of untreatable bacterial infections and adds urgency to the search for new infection-fighting strategies. Contrary to the synthetic drugs, antimicrobials of plant origin are not associated with many side effects and have an enormous therapeutic potential to heal many infectious diseases (Ferreira et al., 2006; Neves et al., 2009).

Malva sylvestris L. (Malvaceae), usually known as common mallow, is native to Europe, North Africa and Asia, and its traditional use has been documented since a long-time ago, although little clinical evidence is available. The Greeks and Romans claimed for its emollient and laxative properties and several ethnobotanical surveys conducted in Europe, highlight the potential of such neglected local resource, which is use today at the brink of disappearance. Roots, shoots, leaves, flowers, fruits, and seeds are applied in infusions, decoctions, poultices, liniments, lotions, baths, and gargles (Barros et al., 2010). Valuable gains have been documented on the bactericidal, bacteriostatic, antifungal and immune-modulatory properties of these *M. sylvestris* and *Malva neglecta* extracts (Grierson and Afolayan, 1999).

The present study investigates the efficacy of chloroform, ethanol and water extracts of these medicinal plants on some bacterial and fungal contaminants of wound infections.

MATERIALS AND METHODS

Sources of plant materials

Total aerial parts of wild *M. sylvestris* and *M. neglecta* were collected freshly from free pastures in mountain areas of East Azerbaijan, Iran.

Preparation of plant extracts

Dried grounded powder from total aerial parts of the plants and

were Soxhlet-extracted sequentially with 250 ml of ethanol, and chloromethane. All of the extracts were filtered (through 0.45 mm filters under sterile conditions), dried using a rotary evaporator at 45°C, and were re-suspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) to achieve the stock concentration 2 mg/ml (Barros et al., 2010).

Individual herb was boiled with 200 ml of distilled water in a conical flask, till the water reduced to 100 ml. The extract was then filtered through filter paper in a sterilized bottle. This made a 50% extract of the herb (Azmi et al., 2010).

Antimicrobial activity

Different concentrations of these extracts were added to fresh cultures of the test microorganisms in MHB broth media, as previously described by National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS)/Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Documents (NCCLS, 2002, 2003). Test microorganisms included *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. Broth dilution assay was performed to evaluate antimicrobial activity of the extracts according to NCCLS/NCLI guidelines (NCCLS, 2002, 2003). After 24 and 48 h incubation at 35°C on shaker, the test cultures as well as control media were evaluated spectrophotometrically at 570 nm (NCCLS, 2003; Magro et al., 2006), and MIC and minimal bactericidal concentration (MBC) values of extracts were recorded (NCCLS, 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

The MIC of *M. sylvestris* and *M. neglecta* extracts are shown in Tables 1 and 2. Among all obtained extracts, ethanol extracts of both species especially that of *M. sylvestris*, showed the best activity against bacteria, followed by aqueous extracts (Tables 1 and 2). The best of antibacterial MIC values was 0.4 mg/ml obtained with *S. pyogenes* cultures (Table 1). All extracts were active against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *P. vulgaris*. Aqueous and chloroform extracts had better antifungal activity. The best of antifungal MIC values was 0.6 mg/ml for *M. sylvestris* aqueous extract against *A. niger* cultures

(Table 1). All extracts had activity against *A. niger*, *A. fumigatus* and *C. albicans*.

The prevention and treatment of wound infections especially after contaminated burn and surgical events is a critical issue. The proper interpretation of cultures taken from wounds is uncertain. Multiple organisms are invariably isolated from non-sterile wounds including indigenous aerobic and anaerobic flora, aerobic gram-negative rods, and fungi. Antibiotic trials with routine antimicrobial agents are losing efficacy due to continual development of antibiotic resistances in the causative microorganisms. The antibacterial spectrum of an agent used for burn and surgical wound treatment and prophylaxis should include coverage for a wide range of microorganisms including pathogenic agents and normal flora, especially strains of antibiotic multi-resistant bacteria (*S. aureus* and *P. aeruginosa*) with different and varying sensitivity patterns. However, the effect of plant extracts and essential oils on cell wall structure has been supported by Burt (2004). The hydrophobic activity of essential oils leads to their penetration into cell membrane lipids and increase of their permeability and this causes dysfunctions in all vital activities associated with cell membrane, removal of ions and vital compounds, and finally cell death (Palmer et al., 2001; Burt, 2004). Presence of fungal agents including *C. albicans* and *A. niger* adds to this coverage problem. The inflammation and healing process of wounds is an additional issue. An ideal treatment may also accelerate the healing process. Natural medicinal plant extracts have an ancient background in this aspect and modern medicine gains valuable benefits with them.

The present study shows the acceptable efficacy of chloroform, water and ethanol extracts of medicinal plants of *M. sylvestris* and *M. neglecta* on some bacterial and fungal contaminants of wound infections. Previous studies have got valuable gains on bactericidal (Cheng and Wang, 2006), antifungal (Magro et al., 2006), and immunomodulatory (Ghaoui et al., 2008) properties of these plant extracts. Our results show that all extracts are active against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *P. vulgaris* which have been reported to be troublesome bacteria in wound infections, especially in the aspect of antibiotic resistance as multi-resistant microorganisms. Ethanol extracts had the highest antibacterial activity than all other solvents. The results suggest that essential oils as non-polar organic compounds could be the main active compounds in these plants. Anthocyanin of *M. sylvestris* has approved bacteriostatic activity (Cheng and Wang, 2006). This water soluble pigment can be responsible for acceptable antibacterial effects of aqueous extracts of both plants. Aqueous extracts of *M. sylvestris* have shown great antifungal activity against stored products fungi including *A. niger* (Magro et al., 2006). *A. niger* is also one of the most important fungal contaminants of wound infections. The efficacy of all extracts especially aqueous extracts against *A. niger*, *A. fumigatus* and

C. albicans of the present study can be promising. The polysaccharide ingredients of aqueous extract of *M. sylvestris* has approved immunomodulatory effects *in vitro* studies; it has shown to switch off IL-4 transcription and to activate macrophages and T helper-1 lymphocytes (Ghaoui et al., 2008). Ongoing studies of the authors of the present study on the *in vivo* application of a combination of extracts especially aqueous and ethanol extracts on infectious and non infectious wounds will be complementary to these results.

Conclusion

Our results add more reasons to the clinical application of these extracts in the prophylaxis and treatment of wound infections. The wide range of the efficacy of these extracts: *A. niger*, *A. fumigatus* and *C. albicans* on different bacterial and fungal agents, and the healing acceleration obtained by these extracts makes them acceptable candidates for the promotion of healing in wound infections.

REFERENCES

- Azmi AA, Jamali S, Muras R, Zaidi AH (2010). Antibacterial activity joshanda: a polyherbal therapeutic agent used in common cold. Pak. J. Pharmacol. 27:25-28.
- Barros L, Carvalho AM, Ferreira CFR (2010). Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. Food Chem. Toxicol. 48:1466-1472.
- Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties application in foods-a review. Int. J. Food Microbiol. 94(3):223-253.
- Cheng C, Wang Z (2006). Bacteriostatic activity of anthocyanin of *Malva sylvestris*. J. Forest. Res. 17(1):83-85.
- Ferreira A, Proença C, Serralheiro MLM, Araújo MEM (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. J. Ethnopharmacol. 108:31-37.
- Ghaoui WB, Ghanem EB, Chedid LA, Abdelnoor AM (2008). The effects of *Alcea rosea* L., *Malva sylvestris* L. and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of Anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice. Phytother. Res. 22(12):1599-1604.
- Grierson D, Afolayan AJ (1999). Antibacterial activity of some indigenous plants used for the treatment of wounds in the Eastern Cape, South Africa. J. Ethnopharmacol. 66(1):103-106.
- Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia L (2006). Efficacy of plant extracts against stored products fungi. Rev. Iberoam Micol. 23(3):176-178.
- NCCLS (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. NCCLS, Wayne, PA.
- NCCLS (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of bacteria that grow aerobically; approved standard – sixth edition. Document M7-A6. NCCLS. Wayne PA.
- Neves JM, Matosa C, Moutinho C, Queiroz G, Gomes LR (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trusos- Montes (northern of Portugal). J. Ethnopharmacol. 124:270-283.
- Palmer AS, Steward J, Fyfe L (2001). The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 18:463-470.

Research Article

Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L. Leaves Extract

Khalid A. Shadid ^{1,2}, Ashok K. Shakya ^{1,2}, Rajashri R. Naik ^{1,2}, Nidal Jaradat ³,
Husni S. Farah ^{2,4}, Naeem Shalan ^{1,2}, Nooman A. Khalaf ^{1,2} and Ghaleb A. Oriquat ^{2,4}

¹Faculty of Pharmacy, Al-Ahliyya Amman University, Amman, Jordan

²Pharmaceutical and Diagnostic Research Centre, Al-Ahliyya Amman University, Amman, Jordan

³Department of Pharmacy, An-Najah National University, P.O. Box 7, Nablus, State of Palestine

⁴Faculty of Allied Medical Sciences, Al-Ahliyya Amman University, Amman, Jordan

Correspondence should be addressed to Khalid A. Shadid; kshadid@ammanu.edu.jo

Received 22 September 2020; Revised 23 December 2020; Accepted 11 March 2021; Published 28 March 2021

Academic Editor: Ajaya Kumar Singh

Copyright © 2021 Khalid A. Shadid et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The plants brought by Arabs were of real therapeutic values. Ibn Al-Baitar, an Islamic scholar (pharmacist, botanist, and physician), in his encyclopedia wrote the detailed characterization of more than one thousand herbs describing their medicinal value, methods of preparation, and their route of administration. **Objectives.** The current investigation points towards the quantitative characterization of the phenolic contents among the four edible *Malva* plants species (*Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L.) and also towards assessing their antibacterial activity against one Gram-positive isolate (*Staphylococcus aureus*) and four Gram-negative strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, and *Proteus vulgaris*. It also aimed to evaluate the free radical scavenging activity of hexane, methanolic, aqueous, and acetone extracts of four *Malva* species. **Methods.** By utilizing the Folin–Ciocalteu procedure and gallic acid as a reference molecule, the phenolic contents were estimated. In addition, the broth microdilution method was used to evaluate four plants' 16 extracts, and the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method was utilized to assess the abovementioned extracts against oxidative stress. **Results.** The results showed that the methanolic extract of *M. oxyloba* has the highest contents of phenols (191.54 ± 2.84 mg of GAE/g) and has the best antioxidant capacity with an IC₅₀ value of 1.94 ± 1.84 µg/ml, which is very close to Trolox. Regarding the ferrous ion chelating activity of the extract, the methanolic extract of *M. sylvestris* exhibits appreciable activity with IC₅₀ values of 52.7 ± 1.8 µg/ml. In addition, the plant extract and acetone extract of *M. sylvestris* showed a strong antibacterial activity with a MIC value of 0.0078 mg/ml. **Conclusion.** The methanolic extract of *M. oxyloba* has a pharmacological potential as a valuable natural product that can be utilized as a main ingredient in the design and development of new therapeutic formulations. It exerts multiple inhibitory properties against oxidative stress and bacterial growth. As such, it is emerging as a promising therapeutic agent for the treatment of various neurodegenerative diseases and many types of human infectious diseases.

1. Introduction

The history of phytotherapy started with our ancestors, who had the knowledge of the herbs and knew that the consumption of certain kinds of herb resulted in the soothing effect of several types of diseases. Recently, herbal remedies have become a controversial issue all over the world as large numbers of herbals are utilized in large quantities in cosmetics, as food preservatives and as nutritional supplements

and as natural ingredient in large number of drugs in many of the pharmaceutical industries. In fact, people around the world are more moving towards or prefer the herbal medicines due to the belief that these phytotherapeutic products are natural and safer than synthetic medicines [1]. In recent years, the term oxidative stress has been gaining interest among many research scientists, and this has led to the development of numerous techniques in the prevention of diseases caused by the action of the harmful free radicals that

cause oxidative stress. In addition, they studied the possible roles of antioxidants in protecting the body from many dangerous diseases caused due to oxidative stress. Common free radical such as hydroxyl (OH[•]), superoxide (O²⁻), and nitric monoxide (NO[•]) are considered as causative agents for many chronic diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis, and other oxidative diseases. At the same time, there are many antioxidant compounds, mostly probably derived from plants, such as vitamin E, vitamin C, creatinine, and other phenolic compounds have the ability to protect the body against the diseases caused by free radicals [2].

It has been observed that the bacterial strains are being increasingly resistant to the antibiotics that are available in the market due to their overuse. The available reports suggest that the overuse of the antiseptic in house and hospitals also contributed to the increase in the resistance of bacteria. However, if the patients with bacterial infection, that is, resistance to antibiotics, did not receive effective treatment may lead to long-term infections that may result in high mortality as was observed in the patients with pneumococcal infections and typhoid fever [3].

Malva (Malvaceae family) is a very common plant growing in wildly in the Middle Eastern countries and commonly known as mallow and has been used by Greek and Romans as an emollient and laxative; also, it has been used to treat some diseases associated with alimentary canal and respiratory disorders. In Asian countries, it is used to treat injuries and inflammations. People use *Malva* species in different ways; many use it in their food; they eat it raw mixed in a salad or cooked as a vegetable. Other people use its flowers for medicinal purpose to treat injuries and different skin disorders [4]. The intensive use of *Malva* species among Arabian population urges us to study and identify the medical and chemical characteristics of *Malva sylvestris* L., *Malva oxyloba* Boiss., *Malva parviflora* L., and *Malva aegyptia* L.

Malva sylvestris is used as a folkloric food and has traditional medicine particularly in the treatment of dermatitis, peptic ulcer, cough, diabetes, and sore throat [5]. It contains tannins, vitamins (A, C, and E), folic acid, niacin, polyphenols (anthocyanins), scopoletin, malvone A (2-methyl-3-methoxy-5,6-dihydroxy-1,4-naphthoquinone) malvaline, malvidin 3-(6''-malonyl -glucoside)-5-glucoside, malvin, flavonoids (three 8-hydroxyflavonoids, hypolaetin 3'-sulphate, and gossypetin 3-sulphate-8-O-β-D-glucoside) polysaccharides (mucilage) and coumarins [6].

In a study established by Tabaraki et al., they identified the bioactive molecule from *Malva sylvestris* using GC-MS technique and found that the major compound in the methanolic extract was 2-methoxy-4-vinylphenol [7]. Moreover, *M. sylvestris* anthocyanins contents reduced plasma total triglycerides and cholesterol and also protected rats from ethanol-induced gastritis due to the high contents of mucilage [8–10].

Hot poultice of *Malva parviflora* used in traditional medicine to treat wounds, swelling, sores, bruises, and broken limbs. It contains tannin, flavonoid, polyphenol, saponin, resin, and alkaloid. Several investigations showed that *M. parviflora* has antiulcerogenic, analgesic, antidiabetic, anti-inflammatory, antibacterial, and neuroprotective activities [11]. Throughout the literature, no previous studies were carried out to

investigate the constituents and the pharmacological activities of *M. oxyloba* and *M. aegyptia*. This prompted us to search for new source of safer and inexpensive antioxidants from four edible species of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants. The extracts were prepared in aqueous solution, hexane, acetone, and methanol solvent; these extracts were tested for their antioxidant activity using DPPH method, and to estimate their total phenol contents using the Folin–Ciocalteu assay, the relationship between antioxidant activity and total phenol contents was correlated; their antimicrobial properties were also studied.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was purchased from Sigma Aldrich company (Denmark), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Folin–Ciocalteu, and Ferrozine reagent were brought from Sigma Aldrich (Germany), while methanol, hexane, and acetone were obtained from Loba Chemie (India). Moreover, dimethyl sulfoxide (DMSO) was brought from Riedel-de Haën (Germany); Mueller–Hinton (Dickinson, USA) and nutrient broth were purchased from HiMedia (India).

2.2. Instruments. Shaker device (Memmert, Germany), rotavap (Heidolph-OB2000, Germany), UV-Visible spectrophotometer (Jenway-7315, England), UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, Japan) Balance (Radwag-AS 220/c/2, Poland, and Shimadzu, Japan), grinder (Molineux N-1, China), filter papers (Macherey-Nagel-MN 617 and Whatman no.1, USA), micropipettes (Finnpipette, Finland), incubator (Nuve-Model 002, Turkey), syringe filter 0.45 μm pore size (Microlab, China), 96-well plates (Greiner Bio-One, North America), and multichannel micropipette (Thermo Fisher Scientific, DE, Germany).

2.3. Collection and Preparation of Plants. The leaves of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants were collected in March 2018 during the flowering time from Tulkarm plains and mountains in the West Bank area of Palestine. The four *Malva* species were identified in the pharmacognosy and herbs laboratory, Faculty of Medicine and Health Sciences, An-Najah National University, Nablus, State of Palestine. The herbarium voucher specimen stored in the Pharmacognosy Laboratory under the following codes: Pharm-PCT-1507, Pharm-PCT-1505, Pharm-PCT-1506, and Pharm-PCT-1502.

The leaves of each of the *Malva* species were washed with distilled water and then dried separately at room temperature. The drying took about 2-3 weeks until all the four plants species materials were well dried. By using the grinder, the dried parts for each type were grounded well, and the material powders were kept under dry condition ready for further use.

2.4. Extraction. The exhaustive maceration was used to extract *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants materials by soaking 150 g of powdered

samples sequentially into 500 ml of distilled water, *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol in an enclosed glass bottle with occasional shaking at room temperature for 72 hrs.

Thereafter, the macerated materials were then filtered through a Whatman No. 1 filter paper and then evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator set at 35°C in a water bath until the solvents completely evaporated, while the aqueous extracts were freeze-dried. The final dried extracts were stored at 4°C in a refrigerator.

2.5. Total Phenol Content. The total phenol contents of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants four extracts were estimated calorimetrically utilizing the Folin–Ciocalteu procedure and gallic acid as a reference molecule [12–14]. Briefly, from each plant fraction, 1 mg/ml aqueous solution was prepared for this analysis, while the reaction mixtures were prepared by taking 0.5 ml of the aqueous solution from each plant fraction, 2.5 ml of 10% Folin–Ciocalteu's testing agent dissolved in water, and 2.5 ml of 7.5% NaHCO₃ in aqueous solution. Thereafter, the produced mixtures were kept in a thermostat at 45°C for 45 min. The absorbance was estimated utilizing a spectrophotometer at a wavelength of 765 nm. All of the studied samples were tested in triplicate for each plant fraction, and the mean values of absorbance obtained were reported. The same method was repeated for the standard molecule gallic acid, and then the required calibration curve was constructed. Based on the measured absorbance, the concentration of gallic acid equivalent was determined in mg of GAEq/g for each working plant sample.

2.6. Free Radical Scavenging DPPH Method. According to the method described by Jothy et al. [15] with some modifications, the antioxidant activity was determined using DPPH scavenging assay. A stock solution of Trolox and 16 plant extracts in methanol was prepared with a concentration of 1 mg/mL; from the stock solution by serial dilution method, various concentrations were prepared. Then, 0.002% DPPH was prepared. A concentration ratio (1:1:1) of the above prepared solution, DPPH, and methanol were arranged, respectively. These solutions were incubated in a dark place for 30 min, while methanol was utilized to zero the UV-Vis-spectrophotometer. Then, the absorbance readings were measured at 517 nm. Antioxidant activity is given as percent DPPH scavenging that is calculated as

$$\% \text{DPPH scavenging} = \frac{M - S}{M} \times 100\%, \quad (1)$$

where *M* is the absorbance of the control sample and *S* is the absorbance of the tested extracts. The results are documented as an IC₅₀ value which is the inhibitory concentration required to decrease 50% of the activity.

2.7. Ferrous Ion-Chelating Activity. The samples were estimated for the ferrous ion-chelating activity as described by Chua et al. [16] Briefly, 750 μL of the sample in test material (2–500 μg/mL) or standard substance (1–50 μg/ml) were

incubated with 50 μL ferrous chloride solution (FeCl₂) (2 mM) for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 50 μL ferrozine solution (5 mM) into the mixture and allowed to stand for 10 minutes in dark. The absorbance of the reaction mixture was measured at 562 nm. All experiments were performed at least in triplicate. The chelating effect was calculated as a percentage using the following equation. EDTA was used as a positive control in this assay.

$$\% \text{chelating activity} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100\%, \quad (2)$$

where *A*_{control} is the absorbance of the control reaction mixture without the test compounds, and *A*_{sample} is the absorbance of the test compounds. IC₅₀ values, which represented the concentration of the extract that caused 50% of Fe²⁺ ion chelation, were calculated from the plot of chelating percentage against concentration.

2.8. Microbial Isolates. The bacterial isolates were obtained from American-type culture collection (ATCC). The isolates included one Gram-positive strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), in addition to four Gram-negative strains: *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Shigella sonnei* (ATCC-25931), and *Proteus vulgaris* (ATCC-838).

2.9. Antimicrobial Test. For determination, the antimicrobial activity for four plants' 16 extracts, a micro broth dilution method was employed. Some colonies from the used bacterial pathogens were planted in agar broth for 24 hrs. A little amount of the bacteria was added inside a 5 ml of Mueller–Hinton tube and was mixed. Then, the turbidity was compared with McFarland standard tube 0.5 (1.5 × 10⁸ cfu/ml). Then, 2 ml of the bacterial suspension was diluted with 4 ml broth. The four *Malva* species extracts were prepared by dissolving 50 mg of each in 1 ml DMSO (100%) with a 50 mg/ml concentration. Then, 100 μl from Mueller–Hinton was placed in a sterile 96-well microplate. By using a micropipette, a volume of 100 μl of plant extracts was added into the first well and mixed. Serial dilution was done by transferring 100 μl from well to next well up to well 11 from which 100 μl was discharged after mixing process; well 12 had only broth without plants extracts, so bacterial growth will be noticed. However, a serial dilution was established under sterile conditions. After that, a 10 μl of bacterial suspension was employed into all wells but not in well 11. While well 12 must be turbid, if not we should know that something wrong happened with our media or bacteria. Then, the used microplate was incubated for 24 h. Each plant extract was examined in duplicate. MIC is defined as the minimum concentration of the antibacterial agents that resulted in nonvisible turbidity compared with a control well.

2.10. Statistical Analysis. The extraction yields, total phenols, and antioxidant results of the four studied plant species were expressed as means ± SD standard deviation. Statistics were compared utilizing unpaired *t*-tests.

TABLE 1: Extractions yields percentages of four *Malva* species in water, hexane, methanol, and acetone.

Extracts	<i>M. sylvestris</i> , % (\pm SD)	<i>M. oxyloba</i> , % (\pm SD)	<i>M. parviflora</i> , % (\pm SD)	<i>M. aegyptia</i> , % (\pm SD)
Aqueous	3.25 \pm 0.75	3.18 \pm 0.61	2.91 \pm 0.55	3.21 \pm 0.41
Hexane	1.01 \pm 0.11	0.97 \pm 0.15	0.89 \pm 0.09	0.74 \pm 0.05
Methanol	4.31 \pm 0.97	5.58 \pm 1.1	3.88 \pm 0.89	5.15 \pm 0.94
Acetone	1.22 \pm 0.12	0.98 \pm 0.09	2.1 \pm 0.047	1.74 \pm 0.65

3. Results

3.1. Plants Extract Yields. The obtained yields of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants aqueous, hexane, methanol, and acetone solvents were calculated and performed in Table 1. The results showed that methanolic extracts of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* have the highest extraction yields, which were 4.31 \pm 0.97, 5.58 \pm 1.1, 3.88 \pm 0.89, and 5.15 \pm 0.94%, respectively.

3.2. Phenolic Content. For the evaluation of total phenol content, the absorption values of several concentrations of the gallic acid standard are listed in Table 2. From the calibration curve of gallic acid (Figure 1), the following equation was used to estimate total phenol content in *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants aqueous, hexane, methanol, and acetone extracts [14].

$$y = 0.0112x + 0.0176, \quad (3)$$

$$r^2 = 0.9956,$$

where y is the absorbance at 765 nm and x is the total phenol content of the four *Malva* plants species various extracts.

Obviously, Table 3 indicates that acetone extract of *M. sylvestris*, the methanolic extract of *M. oxyloba*, and hexane extracts of *M. aegyptia* and *M. parviflora* plants have the highest total phenols among the other screened solvents.

3.3. Antioxidant Activity. The antioxidant activities of hexane, methanol, acetone, and aqueous *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants extracts were evaluated using DPPH free radical method. In addition, in the current study, Trolox, the powerful antioxidant compound, was used as a reference positive control. The DPPH inhibition effects for each studied *Malva* plant species are calculated in Tables 4–7 and shown in Figures 2–5. From Figures 2–5, the IC₅₀ values of hexane, methanol, acetone, and aqueous *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants extracts were calculated in addition to the Trolox standard (IC₅₀ value of 1.86 \pm 0.8 μ g/ml). These results are demonstrated in Table 8, which showed that among *M. sylvestris* extracts, the acetone extract has the highest IC₅₀ value of 4.07 \pm 1.04 μ g/ml, among *M. oxyloba* extracts, the methanolic extract was the best one with IC₅₀ value of 1.94 \pm 1.84 μ g/ml, and among *M. aegyptia* and *M. parviflora* extracts, the hexane extracts were the best with IC₅₀ values of 6.9 \pm 1.42 μ g/ml and 22.9 \pm 1.47 μ g/ml, respectively.

The ferrous ion chelating activity of the different extracts is mentioned in Table 9. It is interesting to mention that the aqueous extract showed better activity than the other

TABLE 2: Absorption values of several concentrations of the standard gallic acid [14].

The concentration of gallic acid (μ g/ml)	Absorption at $\lambda_{\max} = 765$ nm
0.0	0.00
10	0.14
40	0.49
50	0.55
70	0.79

extracts; the IC₅₀ values were ranged from 52.7 \pm 1.8 to 95.5 \pm 3.4 μ g/ml. The hexane extract of different plants was inactive; this might be due to the absence of polar chemical compound which is able to form chelate with the ferrous ion. The acetone extract of the plant exhibited weak activity. The IC₅₀ values ranged from 315.5 \pm 7.0 to 425.5 \pm 10.2 μ g/ml. The ferrous ion chelating activity of *M. sylvestris* was better than the other extracts.

3.4. Antimicrobial Capacities. Most of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants hexane, methanol, acetone, and aqueous extracts exhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, and *Proteus vulgaris* at various levels as presented in Table 10.

4. Discussion

Over thousands of years, the human orientations towards herbal products have been increasing significantly, for food purposes or for the medicinal use. Millions of people around the world believe in the efficacy and safety of the plants as being a natural resource in many areas of their lives. Many valuable medicines have been derived from plant source such as digoxin, vincristine, pilocarpine, atropine, and many others [17].

In recent years, some groups of natural compounds have received remarkable attention including polyphenols and simple phenols, which are an essential group of secondary metabolites with a wide diversity in structures and are biosynthesized in different parts of the plants for various functions such as protection, pigmentation, and pollination [18]. Various investigations have linked a high phenolic diet to the prevention of several cardiovascular, metabolic, infectious, and cancer diseases due to their pharmacological and biological activities [19].

Total phenolic content of all the plant extracts of all the four species of *Malva* were estimated using the Folin–Ciocalteu assay.

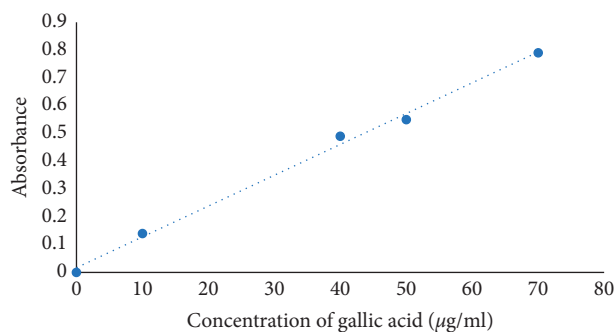


FIGURE 1: Standard calibration curve of gallic acid for the calculation of total phenols [14].

TABLE 3: Quantitative phenol content of the hexane, acetone, methanol, and aqueous extracts of *M. oxyloba*, *M. aegyptia*, *M. sylvestris*, and *M. parviflora*.

Extracts	Total phenol contents, mg of GAE/g of <i>M. oxyloba</i> , \pm SD	Total phenol contents, mg of GAE/g of <i>M. aegyptia</i> , \pm SD	Total phenol contents, mg of GAE/g of <i>M. sylvestris</i> , \pm SD	Total phenol contents, mg of GAE/g of <i>M. parviflora</i> , \pm SD
Acetone	12.35 \pm 0.73	25.28 \pm 2.99	104.01 \pm 2.04	27.54 \pm 2.66
Methanol	191.54 \pm 2.84	77.58 \pm 2.44	20.47 \pm 1.48	42.44 \pm 2.36
Hexane	88.19 \pm 2.79	106.9 \pm 2.22	69.49 \pm 1.15	132.19 \pm 1.97
Aqueous	95.5 \pm 2.67	17.11 \pm 2.15	23.35 \pm 0.76	32.95 \pm 1.67

TABLE 4: DPPH scavenging activity of Trolox and four *M. parviflora* extracts.

Conc.	Trolox	\pm SD	Acetone extract	\pm SD	Methanolic extract	\pm SD	Hexane extract	\pm SD	Aqueous extract	\pm SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	50.72	1.06	29.85	0.63	27.3	1.13	32.8	0.42	10.3	0.44
2	51.0	0.49	36.35	1.34	32.7	0.28	32.8	0.42	31.5	0.45
3	70.2	0.35	36.35	1.34	33.05	1.06	37	0.81	32.1	0.85
5	70.2	0.35	36.9	1.69	35.8	0.35	37.27	1.22	36.5	1.25
7	83.95	0.21	43.1	2.2	37.7	0.98	37.27	2.4	40.0	2.75
10	95.99	1.69	43.1	1.69	37.7	0.99	37.27	2.1	40.1	2.55
20	99.71	1.06	43.1	1.69	39.65	1.2	39.44	1.13	41.0	1.44
30	99.71	0.49	49.2	1.55	43.1	1.99	49.95	4.32	43.2	2.15
40	99.71	0.49	55.0	1.83	44.1	2.4	54.7	0.35	52.1	0.65
50	99.71	0.35	55.0	2.7	47.0	1.97	61.0	2.2	51.5	1.8
80	99.71	2.25	55.0	1.64	47.8	2.6	67.5	0.85	58.1	2.15

TABLE 5: DPPH scavenging activity of Trolox and four *M. oxyloba* extracts.

Conc.	Trolox	\pm SD	Acetone extract	\pm SD	Methanolic extract	\pm SD	Hexane extract	\pm SD	Aqueous extract	\pm SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	50.72	1.06	10.23	0.34	40.7	2.22	10.23	0.37	44	1.7
2	51	0.49	32.92	0.57	52.15	2.82	32.92	0.38	43.15	0.58
3	70.2	0.35	32.9	1.12	62.25	1.5	32.9	1.5	43.35	1.5
5	70.2	0.35	35.65	0.45	85.25	1.34	35.65	0.35	51.13	1.13
7	83.95	0.21	40.86	0.45	95.35	0.85	40.86	0.35	52.13	1.12
10	95.99	1.69	40.86	0.39	95.35	2.22	40.86	0.52	53.13	2.22
20	99.71	1.06	42.09	0.21	96.25	1.75	51.22	1.8	52.45	0.72
30	99.71	0.49	44.1	0.63	96.65	1.99	54.75	0.45	53.42	1.99
40	99.71	0.49	51.18	1.45	96.65	2.11	54.75	0.63	54.41	1.62
50	99.71	0.35	51.18	0.63	96.65	2.1	65.35	0.45	55.5	1.97
80	99.71	2.25	59.17	1.8	99.5	1.34	67	1.88	56.64	1.34

Total phenolic content of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* plants hexane, methanol, acetone, and aqueous extracts were estimated using the

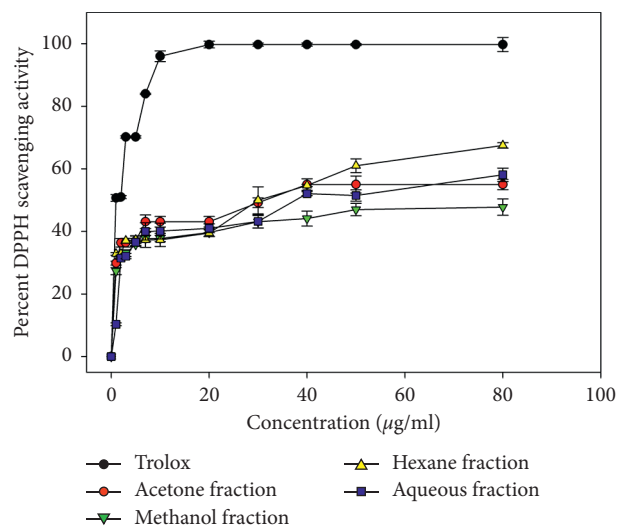
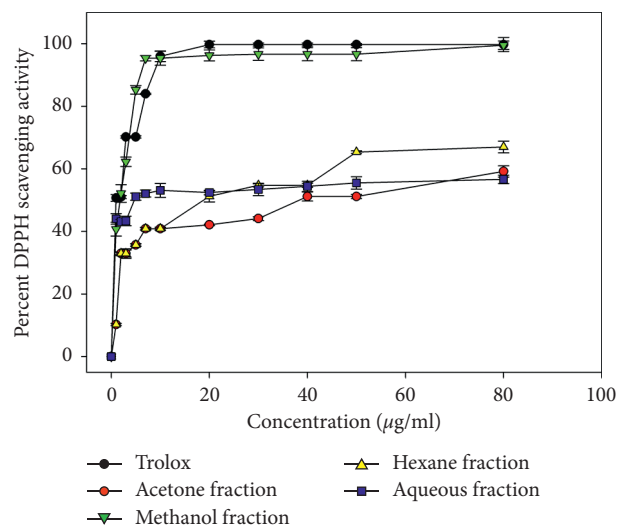
Folin-Ciocalteu assay. However, the results revealed that the total phenolic contents of these herbal species ranged from 12.35 \pm 0.73 to 191.54 \pm 2.84 mg GAE/g. In fact, the methanolic

TABLE 6: DPPH scavenging activity of Trolox and four *M. aegyptia* extracts.

Conc.	Trolox	±SD	Acetone extract	±SD	Methanolic extract	±SD	Hexane extract	±SD	Aqueous extract	±SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	50.72	1.06	43	0.7	39.15	1.48	41.78	1.01	51.78	0.37
2	51.21	0.49	43.25	1.2	38.8	0.98	41.78	1.38	61.78	0.38
3	70.22	0.35	43.25	1.2	44.08	1.3	41.78	1.5	71.78	1.5
5	70.2	0.35	50.13	0.94	49.22	1.1	43.25	0.83	73.25	0.35
7	83.95	0.21	50.13	0.94	49.22	1.1	46.71	0.83	76.71	0.35
10	95.99	1.69	50.13	0.39	49.22	2.22	46.71	0.85	76.71	0.52
20	99.71	1.06	51.4	0.21	63.2	0.7	46.71	1.13	76.71	1.8
30	99.71	0.49	54.4	0.84	63.85	1.99	63.5	1.27	73.5	0.45
40	99.71	0.49	54.4	0.65	64.1	1.62	77.2	1.87	77.2	0.63
50	99.71	0.35	55	2.2	80.5	1.97	94	2.2	84	0.45
80	99.71	2.25	56.84	1.66	82.45	1.34	94.32	2.71	84.32	1.88

TABLE 7: DPPH scavenging activity of Trolox and four *M. sylvestris* extracts.

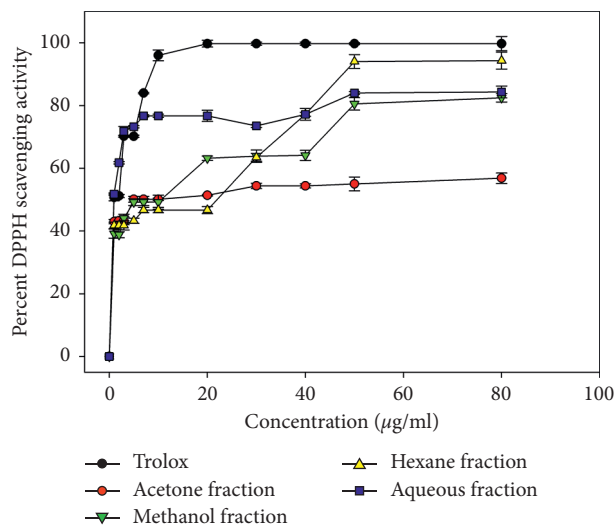
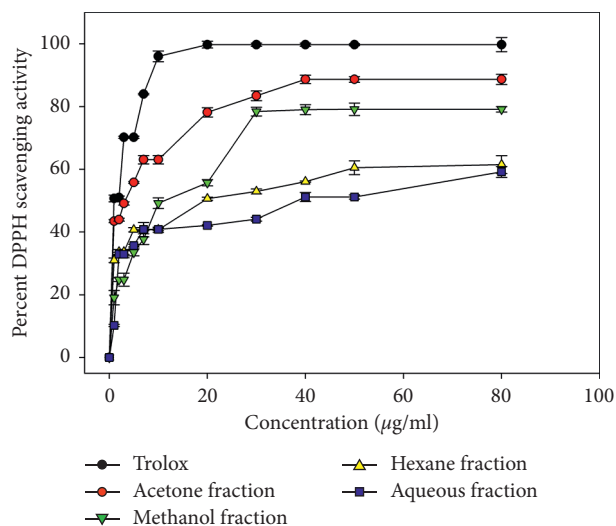
Conc.	Trolox	±SD	Acetone extract	±SD	Methanolic extract	±SD	Hexane extract	±SD	Aqueous extract	±SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	50.72	1.06	43.45	0.49	19.1	2.3	30.97	0.74	10.23	0.34
2	51	0.49	43.95	0.49	24.8	0.57	33.65	0.77	32.92	0.57
3	70.2	0.35	49.13	0.52	24.8	2.1	33.65	0.77	32.9	1.12
5	70.2	0.35	55.8	0.28	33.5	1.1	40.71	0.68	35.65	0.45
7	83.95	0.21	63.05	1.34	37.7	1.7	40.71	2.3	40.86	0.45
10	95.99	1.69	63.05	1.34	49.2	1.7	40.71	0.85	40.86	0.39
20	99.71	1.06	78.15	1.48	55.7	0.99	50.65	0.49	42.09	0.21
30	99.71	0.49	83.4	1.55	78.4	1.4	52.95	0.77	44.1	0.63
40	99.71	0.49	88.65	1.34	79	1.62	56.05	0.21	51.18	1.45
50	99.71	0.35	88.65	0.91	79.12	1.97	60.5	2.2	51.18	0.63
80	99.71	2.25	88.65	1.66	79.12	0.88	61.5	2.83	59.17	1.71

FIGURE 2: DPPH scavenging activity of Trolox (reference compound) and four *M. parviflora* extract.FIGURE 3: DPPH scavenging activity of Trolox (reference compound) and four *M. oxyloba* extracts.

extract of *M. oxyloba* showed the highest phenolic content (191.54 ± 2.84 mg GAE/g), followed by the hexane extracts of *M. parviflora* and *M. aegyptia* plants (106.9 ± 2.22 mg GAE/g) and (132.19 ± 1.97 mg GAE/g), respectively, and *M. sylvestris* (104.01 ± 2.04 mg GAE/g), whereas *M. oxyloba* acetone extract

showed the lowest phenolic content (12.35 ± 0.73 mg GAE/g) among all the extract of these plants.

In a study conducted by Afolayan et al., the total phenolic content in the methanolic extract of *M. parviflora* was 2.9 ± 0.03 mg GAE/g [20]. Another study performed by

FIGURE 4: DPPH scavenging activity of Trolox (reference compound) and four *M. aegyptia* extracts.FIGURE 5: DPPH scavenging activity of Trolox (reference compound) and four *M. sylvestris* extracts.TABLE 8: DPPH Free radical scavenging antioxidant activity (IC_{50}) values.

Extracts	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. oxyloba</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. aegyptia</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. sylvestris</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. parviflora</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of Trolox
Acetone	32.35 ± 0.73	15.48 ± 0.99	4.07 ± 1.04	27.54 ± 1.66	
Methanol	1.94 ± 1.84	7.58 ± 1.44	10.47 ± 1.48	72.44 ± 1.36	
Hexane	18.19 ± 0.79	6.9 ± 1.42	19.49 ± 1.15	22.9 ± 1.47	1.86 ± 0.80
Aqueous	15.5 ± 0.67	7.11 ± 2.15	33.35 ± 0.76	32.95 ± 0.67	

$n = 3$ individual experiments.

TABLE 9: Ferrous ion chelating activity of extracts (IC_{50}) values.

Extracts	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. oxyloba</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. aegyptia</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. sylvestris</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ of <i>M. parviflora</i>	IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$), $\pm\text{SD}$ EDTA
Acetone	425.5 ± 10.2	405.1 ± 3.2	315.5 ± 7.0	350.0 ± 6.2	
Methanol	269.1 ± 6.3	295.2 ± 5.1	225.2 ± 4.5	260.2 ± 8.2	
Hexane	—	—	—	—	12.1 ± 1.1
Aqueous	95.5 ± 3.4	86.1 ± 4.7	52.7 ± 1.8	75.8 ± 7.4	

$n = 3$ individual experiments.

TABLE 10: Antimicrobial activities (MICs) of the acetone, hexane, and methanolic fractions of *Malva* species.

Microorganisms	MIC, mg/ml acetone extract				MIC, mg/ml hexane extract				MIC, mg/ml methanolic extract				MIC, mg/ml aqueous extract			
	MS	MO	MA	MP	MS	MO	MA	MP	MS	MO	MA	MP	MS	MO	MA	MP
<i>S. aureus</i>	0.125	3.125	6.25	25	—	—	12.5	25	12.5	3.125	6.25	50	12.5	6.25	12.5	3.125
<i>S. sonnei</i>	3.125	25	6.25	—	25	25	0.125	12.5	12.5	3.125	—	6.25	6.25	—	—	12.5
<i>E. coli</i>	12.5	12.5	3.125	6.25	25	—	12.5	12.5	6.25	0.078	3.125	25	50	25	12.5	—
<i>P. aeruginosa</i>	3.125	25	6.25	12.5	—	6.25	6.25	6.25	6.25	0.78	6.25	6.25	—	1.56	—	3.125
<i>P. vulgaris</i>	0.078	6.25	6.25	12.5	—	12.5	12.5	6.25	12.5	6.25	25	12.5	12.5	—	6.25	3.125

—: no bacterial inhibition, MO: *Malva oxyloba*, MS: *Malva sylvestris*, MA: *Malva aegyptia*, and MP: *Malva parviflora*.

Tabaraki et al. found that the total phenolic content of *M. sylvestris* methanolic extract was 15.11 ± 0.28 mg GAE/g [7]. However, another study established by Beghdad et al. showed that the total phenolic content of the *M. sylvestris* leaves extract was 24.12 ± 0.72 mg GAE/g [21].

In the last two decades, the health benefits of antioxidant molecules obtained from various species of vegetables and plants have become the major focus of the researchers due to the fact that many of these dangerous diseases such as cancer, diabetes, atherosclerosis, and many other stress-related diseases can be prevented by the appropriate use of these products [22].

Several reports suggest that, due to the side effects, adverse reactions, and possible carcinogenic effects of using chemically synthesized antioxidants, there is a universal agreement that the chemical antioxidants need to be replaced with natural ones. Therefore, the present study aims to explore the antioxidant capacities of the *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* hexane, methanol, acetone, and aqueous extracts. Due to the side effect, adverse reaction, and the possible carcinogenic effect that come along the continuous use of chemically synthesized antioxidants, several reports suggest that there is a universal agreement on the replacement of the chemically synthesized antioxidant with the natural ones. Therefore, the present study was aimed to explore the antioxidant capabilities of the *Malva* species with various extracts.

In the current study, the antioxidant capacities were estimated using the DPPH scavenging method and comparing the obtained results with a positive control compound Trolox that has IC_{50} 1.86 μ g/ml. The plants, in general, showed high antioxidant activity ranging from 1.94 ± 1.84 to 72.44 ± 1.36 μ g/ml. Particularly, the methanolic extract of *M. oxyloba* showed the highest antioxidant capacity with IC_{50} value of 1.94 ± 1.84 μ g/ml among the other methanolic extracts studied; this was followed by the acetone extract of *M. sylvestris* (4.07 ± 1.04 μ g/ml), which had the highest antioxidant activity among the other acetone extracts studied. In addition, the hexane extract of *M. aegyptia* showed the highest antioxidant activity (6.9 ± 1.42 μ g/ml) among the other hexane extracts, and finally, the aqueous extracts of *M. aegyptia* showed the highest antioxidant (7.11 ± 2.15 μ g/ml) among the other aqueous extracts. The lowest antioxidant activity was observed in all the four extracts of *M. parviflora*. This study shows that methanolic extract of *M. oxyloba* has the IC_{50} value almost similar to the value of Trolox (1.86 μ g/ml),

which suggests that this extract can be used as a natural alternative therapy for the prevention and treatment of various degenerative diseases and disorders.

Afolayan and his coworkers reported the IC_{50} value of *M. parviflora* to be 94.3 ± 0.03 μ g/ml [20]. In another study, Beghdad et al. showed that *M. sylvestris* leaves extract had an antioxidant IC_{50} value of 16.691 ± 0.2 μ g/ml [21]. This suggests that the results obtained in the present investigation have the highest IC_{50} values when compared to other studies indicating that the plant species has the highest free radical scavenging activity which may be due to their total phenolic content, and in the present studies, the total phenolic content was the highest among all the reported literatures.

Bacterial resistance to many of the recently used modern antibiotics has become a common phenomenon. This has prompted many researchers to look for new chemical from natural origin or plant origin which is safer and effective in overcoming the resistance issue; to study the antimicrobial activity from plant origin, many experts went to study herbal antimicrobial effect trying to solve bacterial resistance problem and to develop new drugs [23].

In the present study, all the four extracts of the *Malva* species were used to explore the antimicrobial potentials against the five bacterial strains using the broth microdilution method.

In the present study, the antimicrobial activity of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* species hexane, methanol, acetone, and aqueous extracts was conducted against five bacterial strains using the broth microdilution method. The results showed that *M. sylvestris* acetone extracts inhibited the bacterial growth with the highest MIC values of 0.125 mg/ml against *S. aureus* and 0.078 mg/ml against *P. vulgaris* among the other acetone extracts. In addition, the hexane extract of *M. aegyptia* inhibited the highest growth of bacterial strains among hexane extracts of the other plants with MIC value of 0.125 mg/ml against *S. sonnei*. Moreover, the methanolic extract of *M. oxyloba* showed the highest antibacterial activity among the others methanolic extracts with MIC values of 0.078 and 0.78 mg/ml against *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively, while the aqueous extracts of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* showed weak antibacterial activity in comparison with the other plants extracts. In fact, *M. sylvestris* acetone extract exhibited strong activity against *P. vulgaris* with MIC value of 0.078 mg/ml, while *M. oxyloba* methanolic extract showed

appreciable activity against *E. coli* with MIC value of 0.078 mg/ml.

In a study conducted by Razavi et al. [10], they found that the methanolic extract of *M. sylvestris* inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with MIC values of 32 and 36 mg/ml, respectively [10]. At the same time, in the present study, the methanolic extract of *M. sylvestris* inhibited the growth of the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with MIC values of 6.25 and 12.5 mg/ml, respectively.

In fact, due to the high phenolic contents of *M. sylvestris*, *M. oxyloba*, *M. parviflora*, and *M. aegyptia* species, the hexane, methanolic, acetone, and aqueous extracts of these species showed strong antibacterial activities, and several prior researches generally confirm that the phenolic compounds affect strongly the microbial growth [24].

These finding indicated that the acetone extract of *M. sylvestris* and the methanolic extract of *M. oxyloba* can be used as a suitable candidate in the manufacturing of natural phytoalexins and as a natural alternative to synthetic antibiotics. In line with previous studies, the current study found a strong positive correlation between antioxidant activities of plants extracts and total phenolic content, which implies that the studied plant's phenols are the major contributor to the antioxidant activity in these extracts. Naturally, occurring phenols have an antioxidant activity as these molecules have the ability to scavenge free radicals by a single-electron transfer mechanism which decreases the oxidative stress in life cells and tissues [7].

5. Conclusion

In view of the abovementioned results, the methanolic extract of *M. oxyloba* is a pharmacologically valuable natural product that can be utilized as the backbone for the design and development of new therapeutic formulations. It exerts multiple inhibitory properties against oxidative stress and bacterial growth. As such, it represented promising therapeutic agents for the treatment of various neurodegenerative diseases and many types of human infectious diseases.

It may be concluded from our studies that the methanolic extract of the *M. oxyloba* is of great pharmacological value, as this natural product can be utilized in the design and development of the new therapeutic formulations as the main ingredient. Due to its inhibitory properties against oxidative stress and bacterial growth, it may be one of the promising therapeutic agents to treat various neurodegenerative diseases and many of the infectious diseases in human.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available within the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank the Dean of the Faculty of Pharmacy and Medical Sciences, Dean, Scientific Research, Al-Ahliyya Amman University, Amman, Jordan, and Dean, Faculty of Medicine and Health Sciences, An-Najah National University, Nablus, Palestine, for providing necessary facilities and support.

References

- [1] M. Ekor, "The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 4, pp. 177–186, 2014.
- [2] S. Tas, B. Tas, N. Bassalat, and N. Jaradat, "In-vivo, hypoglycemic, hypolipidemic and oxidative stress inhibitory activities of Myrtus communis L. fruits hydroalcoholic extract in normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats," *Biomedical Research*, vol. 29, pp. 2727–2734, 2018.
- [3] N. Jaradat, N. Shawarb, F. Hussein et al., "Antibacterial and antioxidant screening of semi-synthetic naringin based hydrazone and oxime derivatives," *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 11, Article ID e65496, 2018.
- [4] M.-A. Jabri, D. Wannes, N. Hajji, M. Sakly, L. Marzouki, and H. Sebai, "Role of laxative and antioxidant properties of Malva sylvestris leaves in constipation treatment," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 89, pp. 29–35, 2017.
- [5] J. C. Gasparetto, C. A. F. Martins, S. S. Hayashi, M. F. Otuky, and R. Pontarolo, "Ethnobotanical and scientific aspects of Malva sylvestris L.: a millennial herbal medicine," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 64, no. 2, pp. 172–189, 2012.
- [6] P. Dipak, "A review on biological activities of common mallow (*Malva sylvestris* L.)," *Innovare Journal of Life Sciences*, vol. 5, pp. 1–5, 2016.
- [7] R. Tabaraki, Z. Yosefi, and G. H. A. Asadi, "Chemical composition and antioxidant properties of Malva sylvestris L.," *Journal of Research in Agricultural Sciences*, vol. 8, pp. 59–68, 2012.
- [8] W. Zhen-Yu, "Impact of anthocyanin from Malva sylvestris on plasma lipids and free radical," *Journal of Forestry Research*, vol. 16, no. 3, pp. 228–232, 2005.
- [9] I. Gürbüz, A. M. Özkan, E. Yesilada, and O. Kutsal, "Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, no. 1-3, pp. 313–318, 2005.
- [10] S. M. Razavi, G. Zarrini, G. Molavi, and G. Ghasemi, "Bio-activity of Malva sylvestris L., a medicinal plant from Iran," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 14, no. 6, p. 574, 2011.
- [11] T. L. Shale, W. A. Stirk, and J. Van Staden, "Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of Malva parviflora and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 96, no. 1-2, pp. 325–330, 2005.
- [12] V. L. Singleton and J. A. Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, pp. 144–158, 1965.
- [13] L. M. Cheung, P. C. K. Cheung, and V. E. C. Ooi, "Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts," *Food Chemistry*, vol. 81, no. 2, pp. 249–255, 2003.
- [14] N. Jaradat, M. Qneibi, M. Hawash et al., "Chemical composition, antioxidant, antiobesity, and antidiabetic effects of Helichrysum sanguineum (L.) Kostel. from Palestine,"

- Arabian Journal for Science and Engineering*, vol. 46, no. 1, pp. 41–51, 2021.
- [15] S. L. Jothy, A. Aziz, Y. Chen, and S. Sasidharan, “Antioxidant activity and hepatoprotective potential of polyalthia longifolia and cassia spectabilis leaves against paracetamol-induced liver injury,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 561284, 10 pages, 2012.
- [16] M.-T. Chua, Y.-T. Tung, and S.-T. Chang, “Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*,” *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 6, pp. 1918–1925, 2008, p.
- [17] H. Yuan, Q. Ma, L. Ye, and G. Piao, “The traditional medicine and modern medicine from natural products,” *Molecules*, vol. 21, no. 5, p. 559, 2016.
- [18] D. Lin, M. Xiao, J. Zhao et al., “An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes,” *Molecules*, vol. 21, no. 10, p. 1374, 2016.
- [19] S. González, M. Fernández, A. Cuervo, and C. Lasheras, “Dietary intake of polyphenols and major food sources in an institutionalised elderly population,” *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, vol. 27, no. 2, pp. 176–183, 2014.
- [20] A. J. Afolayan, O. M. Aboyade, and M. O. Sofidiya, “Total phenolic content and free radical scavenging activity of *Malva parviflora* L. (Malvaceae),” *Journal of Biological Sciences*, vol. 8, no. 5, pp. 945–949, 2008.
- [21] M. C. Beghdad, C. Benammar, F. Bensalah, F.-Z. Sabri, M. Belarbi, and F. Chemat, “Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content in leaves, flowers, stems and seeds of mallow (*Malva sylvestris* L.) from North Western of Algeria,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 13, pp. 59–68, 2014.
- [22] A. Rahal, A. Kumar, V. Singh et al., “Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay,” *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 761264, 19 pages, 2014.
- [23] R. Capita and C. Alonso-Calleja, “Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 53, no. 1, pp. 11–48, 2013.
- [24] R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, C. Meier et al., “Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 90, pp. 494–507, 2001.

Bioactivity of *Malva Sylvestris* L., a Medicinal Plant from Iran

*¹Seyed Mehdi Razavi, ²Gholamreza Zarrini, ¹Ghader Molavi, ³Ghader Ghasemi

Abstract

Objective(s)

Malva sylvestris L. (Malvaceae), an annual plant, has been already commonly used as a medicinal plant in Iran. In the present work, we evaluate some bioactivities of the plant extracts.

Materials and Methods

The aird-dried plant flowers and leaves were extracted by soxhlet apparatus with n-hexane, dichloromethane and methanol. The antimicrobial, cytotoxic, and phytotoxic of the plant extracts were evaluated using disk diffusion method, MTT, and Lettuce assays, respectively.

Results

Both flowers and leaves of *M. sylvestris* methanol extracts exhibited strong antibacterial effects against *Erwinia carotovora*, a plant pathogen, with MIC value of 128 and 256 µg/ml, respectively. The flowers extract also showed high antibacterial effects against some human pathogen bacteria strains such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, with MIC value of 192, 200 and 256 µg/ml, respectively. The plant methanol extracts had relatively high cytotoxic activity against MacCoy cell line.

Conclusion

We concluded that *Malva sylvestris* can be candidated as an antiseptic, a chemopreventive or a chemotherapeutic agent.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Cytotoxicity, *Malva sylvestris*

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

* Corresponding author: Tel: +98- 451- 5514702; Fax: +98- 451- 5514701; email: razavi694@gmail.com

2- Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Department of Statistics, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Introduction

Genus *Malva* L. (Malvaceae) is represented by 40 taxa in all over of the world. *Malva sylvestris* L. is an annual plant with shallowly lobed leaves and purple flowers which bloom in late spring. This plant is native to Europe, North Africa and South-west Asia. The plant prefers damp areas, such as the ocean, salt marshes, meadows, sides of ditches and banks of tidal rivers (1).

M. sylvestris is commonly used as vegetable and a medicinal plant in Iran where it is named as Panirak. The plant flowers are used as a remedy for cut wound, eczema, dermal infected wounds, bronchitis, digestive problems, and inflammations (2). Regarding the results of wang (2005), anthocyanins from *M. sylvestris* caused decreases in total cholesterol and triglycerides of plasma. It is also shown that the extracts of some *Malva* species protected rats from gastric lesions induced by ethanol. This antiulcerogenic activity may be associated with the high mucilage content from the plant species (3).

There are many reports on phytochemicals from *M. sylvestris*. Some reports revealed the presence of malvone A, a naphthoquinone and different known monoterpenes, aromatic compounds, and a tetrahydroxylated acyclic diterpene (4, 5).

In the present work, we evaluated cytotoxic, phytotoxic, and antimicrobial activities of different plant extracts.

Materials and Methods

Plant materials

The flowers and leaves of *M. sylvestris* were collected from around Tabriz, Iran during June 2009. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (No: 1389-2).

Preparation of the extracts

Air-dried plant flowers and leaves were extracted using a soxhlet type apparatus with n-hexane, dichloromethane, and methanol, respectively. The extracts were dried in vacuum.

Antibacterial assay

The antibacterial activities of the plant extracts were determined against *Escherichia coli* (PTCC 1047), (Persian Type Culture Collection) *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112), *Enterococcus faecalis* (PTCC 1190), *Streptococcus agalactiae* (PTCC 1321), *Erwinia carotovora* (PTCC 1675), and *Staphylococcus aureus* (E₃₈) by the disc diffusion method (Razavi *et al.*, 2009 b). Muller- Hinton agar (MHA) (Oxoid) was used for preparation of the media of bacteria. The filter paper discs (6 mm in diameter) were individually impregnated with 15 µl of stock solution of the plant extracts (1.5 mg/ml) and then placed onto the agar plates which had previously been inoculated with the tested microorganisms. The plates were inoculated at 37 °C for 24 hr. The diameters of inhibition zones were measured in millimeters. All the tests were performed in duplicate. Gentamicin (10 µg) and erythromycin (15 µg) served as positive control. The MICs of the extracts against the test microorganisms were determined by the Agar dilution method (6).

Antifungal assay

The antifungal activities of the plant extracts were determined against *Candida kefyr* (ATCC 3896), *Candida albicans* (ATCC 14053), *Aspergillus niger* (PLM 1140), *Penicillium SP*, and *Sclerotinia sclerotiorum* by the disc diffusion method (Lorain 1996). Sabouraud dextrose agar (SDA) (Oxoid) was used for preparation of the media of the fungal strains. The filter paper discs (6 mm in diameter) were individually impregnated with 15 µl of stock solution of the extracts (1.5 mg/ml) and then placed onto the agar plates which had previously been inoculated with the tested microorganisms. Amphotericin B (10 µg) disc was applied as positive control and the plates were inoculated with the fungi incubated at 30 °C for 48 hr. The diameters of inhibition zones were measured in millimeters. All the tests were performed in duplicate. The MICs of the extracts against the test microorganisms were determined by the agar dilution method (6).

Cell culture conditions and cytotoxic assay

MacCoy cell lines (Pasteur, C₁₂₃) were grown in

RPMI 1640 (Gibco, No 51800-019) medium. Each 500 ml of the medium consisted of 5.2 g RPMI powder, 1 g of sodium bicarbonate, 1% W/V of penicillin/streptomycin and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) in deionized water (7). Completed medium was sterilized by filtering through 0.22 µm microbiological filters (Art no 11107-25). Cell line was maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C in an incubator. The stock solutions of methanol extracts of *M. sylvestris* flowers and leaves were prepared by dissolving the compound in 100 µl DMSO (1 mg/ml). The final concentration of the extract was 0.70, 0.50, 0.30, 0.3, 0.10, and 0.05 mg/ml. Cells were plated in the appropriate media on 24-well microplates in a 500 µl total volume at a density of 6×10⁵ cell/ml. Three different tests were performed for each concentration to validate the results. The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for a time course of 16 hr. For evaluating cell viability, the media were removed and 50 µl of a 5 mg/ml solution of MTT was added to each treated cell culture. The cells were incubated for 3 hr at 37 °C in 5% CO₂ and the formazan crystals were dissolved in 1 ml DMSO until the color reaction became uniform. The optical density was determined at 570 nm using a spectrophotometer. The amount of MTT converted to formazan is a sign of the number of viable cells. Media-only treated cells served as the indicator of 100% cell viability. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was defined as the concentration that reduced the absorbance of the untreated wells by 50% of the control in the MTT assay. Viability percentage was evaluated as $OD_{\text{treatment}}/OD_{\text{control}}$ (8).

Phytotoxic assay

Lettuce (*Lactuca sativa* L. CV. Varamin) seeds were used to test germination response to different concentration of the plant root extracts. The stock solutions of the methanol extract were prepared by dissolving the extracts in the minimum volume of dimethylsulphoxide (DMSO). The stock of methanol extract of *M. sylvestris* leaves was obtained by dissolving in the sterile water. Different concentration of extracts (1, 0.1,

0.01, 0.001 mg/ml) were obtained by dilution with deionized water. Parallel controls were performed with the same volume of DMSO. All seeds were surface sterilized with sodium hypochloride (1%). Four replicates, each of 25 seed, were prepared for each treatment using sterile Petri dishes (90 mm) lined with one sterile filter paper (Whatman, number 2). Five ml of different concentration of the extracts was added to each Petri dish. Prepared plates were then placed in a germination cabinet at 25 °C in the dark. Germination was deemed to occur only after the radicle had protruded beyond the seed coat by at least 1 mm. After 1 week, in the each treatment, germination percentage was determined (9, 10).

Statistical analysis

In all assays, SPSS 11.5 software was used for statistical analysis. Analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan test was used to see the difference amongst various groups. The significance level was set at $P < 0.05$.

Results

The results of antibacterial assay indicated that both flowers and leaves of *M. sylvestris* methanol extracts exhibited high bactericidal activity. The extracts were found to have strong antibacterial effects against *Erwinia carotovora*, a common plant pathogen bacteria, with MIC value of 128 and 256 µg/ml for the flowers and leaves extracts, respectively. The methanol extract of the plant flowers showed high antibacterial effects against some human pathogen of bacteria strains such as *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Entero. faecalis*, with MIC value of 192, 200, and 256 µg/ml, respectively. Both flowers and leaves methanol extracts of the plant possessed modest antibacterial activity against other tested microorganism with MIC value range of 320-800 µg/ml (Table 1).

On the other hand, antifungal assay showed that the methanol extract of the plant flowers indicated modest antifungal activity. The extract inhibited the growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, a plant pathogen fungus, and some human pathogen fungus like *C. kefir* and

C. albicans with MIC range of 640-800 µg/ml (Table 1).

No considerable antibacterial and antifungal activity were found for the plant n-hexane and dichloromethane extracts.

Our finding also showed that the plant methanol extracts exhibited rather high cytotoxic activity against McCoy line. The flower and leaves extracts reduce the viability

of McCoy cells with IC₅₀ value of 265.3 and 311.0 µg/ml, respectively (Figure 1).

On the other hand, we did not find considerable phytotoxic activity for *M. sylvestris* extracts. This finding revealed that there is no significant differences in seed germination between seed treated with the different concentration of the plant extracts and control test in seed germination (Table 2).

Table 1. Antimicrobial effects of methanolic extracts of *Malva sylvestris*

Treatment Microorganism	Leaf extract (1500 µg)		Flower extract (1500 µg)		Erythromycin (30 µg)	Gentamicin (3 µg)	Amphotericin (10µg)
	IZ (mm)	MIC (µg/ml)	IZ (mm)	MIC (µg/m)	IZ (mm)	IZ (mm)	IZ (mm)
	<i>Escherichia coli</i>	640	32.0	512	31.0	16.0	20.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	320	36.0	192	39.0	19.0	20.0	-
<i>Entrococcus faecalis</i>	340	35.0	256	38.0	21.0	16.0	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	320	35.6	200	38.0	21.0	16.0	-
<i>Erwinia carotovora</i>	256	37.0	192	39.0	21.0	19.0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (E ₃₈)	320	36.0	655	39.0	-	-	34.0
<i>Candida kefyri</i>	800	28.0	640	30.0	-	-	29.0
<i>Candida albicans</i>	800	26.5	640	28.0	-	-	24.0
<i>Aspergillus niger</i>	950	19.0	800	20.0	-	-	23.0
<i>Penicillium sp</i>	950	12.0	800	20.0	-	-	28.0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	950	19.0	800	21.0	16.0	20.0	-

IZ= Inhibition zone

MIC= Minimum inhibitory concentration

Table 2. Phytotoxic effects of *Malva sylvestris* leaves extracts

Concentration (mg/ml)	(%) Germination		
	Hex	DCM	Met
0	98 ± 2.3 a	92 ± 5.3 a	90 ± 3.8 a
0.001	96 ± 3.1 a	98 ± 3.2 a	96 ± 2.2 a
0.01	96 ± 2.2 a	96 ± 1.4 a	92 ± 3.2 a
0.1	98 ± 3.3 a	92 ± 1.5 a	94 ± 2.5a
1	92 ± 2.4 a	94 ± 1.8 a	90 ± 23.6a

Mean values in the same column followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level according to the Duncan test. Hex: n-hexane extract, DCM: dichloromethane extract, Met: methanol extract

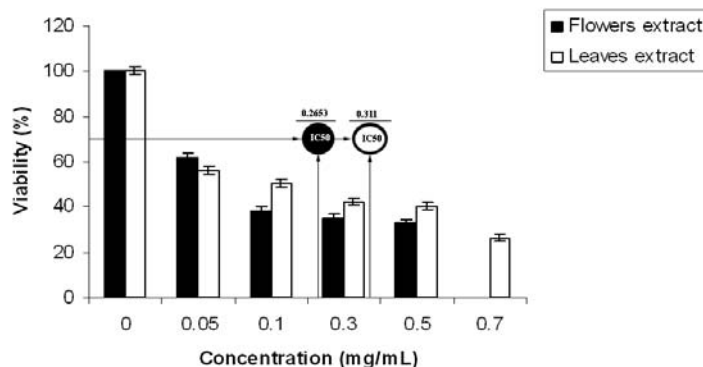


Figure 1. Cytotoxic effects of methanol extract of *M. sylvestris* on MacCoy cells. Each bar represents standard error of the mean

Discussion

A literature study reported various pharmacological properties for *M. sylvestris* and other species of *Malva*. It is well-known that *M. sylvestris* can be utilized as an anti-inflammatory substance for the respiratory tract, GI tract, and the skin (11). The plant can be used topically or in a bath to treat abscesses, bruises, burns, dermatitis, swellings, and various ulcers (12, 13).

It is assumed that this pharmacological and biological activity of the plant should be attributed to presence of anthocyanidines, naphthaquinones, flavonoides or mucilaginous polysaccharides that are in high amounts in the plant fruits, flowers, leaves, and roots.

A naphthaquinone, namely, malvone A has been reported from stems of *M. sylvestris*. It was also shown that malvone A was regarded as a phytoalexin and was induced by some plant pathogen microorganisms (4). Therefore, this compound could be responsible for high antimicrobial activity of the *M. sylvestris* against different plant and human pathogen microorganisms. Therefore, the *M. sylvestris* extracts could be a good candidate for making a biopesticide. Nowadays, in spite of the successful pest control achieved with synthetic pesticides, the use of these chemicals has negative effects on environments and human being. Therefore, the use of the natural compounds for pest control might be one of the alternatives for environmentally friendly agriculture.

Our results revealed that *M. sylvestris* possesses antibacterial effects on meticcillin

resistant strain of *staph. aureus* (E38). At the recent years, the development of bacterial resistance to presently available antibiotics has caused a serious problem for global hygienic and health programs. This problem has necessitated the search for new antimicrobial agent with natural navigate.

The results herein reported, showed that *M. sylvestris* extracts exhibits high cytotoxic activity. Therefore, this plant could be considered as an antiproliferative agent. The plant has a rich ethnomedicinal history and has been used since ancient Greece and Roman times. The above ground portions of the plant have been used in pancakes and salads, cooked as greens and used as stuffing in some countries. The immature fruits may be consumed raw as a snack, as well (14). Therefore, high consumption of the plant leaves, flowers or fruits could be associated with a reduced risk of cancer.

Conclusion

It was concluded that *M. sylvestris* indicated considerable bioactivities. This Iranian native plant can be used as an antiseptic agent to eliminate antibiotic resistance microorganisms.

Acknowledgment

This work was supported by University of Mohsghegh Ardabili. The authors would like to thank Mrs F. Gholami for her technical support. We are also thankful to Mrs F. Zahri for her assistance.

References

1. Davis PH. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Vol2. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1966.
2. Pirbalouti AG, Yousefi M, Heshmetollah N, Karimi I, Koochpayeh A. Evaluation of burn healing properties of *Arnehia euchroma* and *Malva sylvestris*. Electron J Biol 2009; 5:62-66.
3. Gurbuz I, Ozkan AM, Yesiada E, Kutselm O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of pinnarbasi. J Ethnopharmacol 2005; 101:313-318.
4. Veshkorova O, Golubenko Z, Pshenichnov E, Avzanov I, Uzbekov V, Sultanova S, *et al*. Malvone A, a phytoalexin found in *Malva sylvestris* (Family Malvaceae). Phytochemistry 2010; 67:2376-2379.
5. Cutillo F, D'Abrosca B, Dellagrecia M, Fiorentino A, Zarrelli A. Terpenoides and phenol derivatives from *Malva sylvestris*. Phytochemistry 2006; 67:481-485.
6. Razavi SM, Zarrini G. Bioactivity of aviprin and aviprin-3"-O-glucoside, two linear furanocoumarins from Apiaceae. Bioorg Khim 2010; 36:359-362.
7. Razavi SM, Nejad-Ebrahimi S. Chemical composition, allelopathic and cytotoxic effects of essential oils of flowering tops and leaves of *Crambe orientalis*. Nat Prod Res 2009; 23:1492-1498.

Bioactivity of *Malva Sylvestris* L., a Medicinal Plant

8. Razavi SM, Zarrini G, Zahri S, Mohammadi S. Biological activity of *Prangos uloptera*, a medicinal plants from Iran. *Nat Prod Res* 2010; 24:797-803.
9. Razavi SM, Ghasemiyan A, Salehi S, Zahri F. Screening of biological activity of *Zosima absinthifolia* fruits extracts. *Eur Asia J Bio Sci* 2009; 4:25-28.
10. Razavi SM, Zahri S, Motamed Z, Ghasemi G. Bioscreening of oxypeucedanin, a known furanocoumarin. *Iran J Basic Med Sci* 2010; 13:133-138.
11. Guarrera PM. Traditional phytotherapy in central italy (Marche, Abruzzo and Latium). *Fitotrapia* 2005; 76:1-25.
12. Camejo- Rodrigues J, Ascensao L, Bonet MA, Valles J. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the natural park of Serra de Sao Maeda (Portugal). *J Ethnopharmacol* 2003; 89:199-209.
13. Wang ZY. Impact of anthocyanin from *Malva sylvestris* on plasma lipids and free radical. *J For Res* 2005; 16:228-232.
14. Dogan Y, Baslar S, Ay G, Mert HH. The use of wild edible plants in Western and Central Anatolia (Turkey). *Econ Bot* 2004; 58:684-690.

Archive of SID