








Synergetic bactericide activity against MRSA and *S. aureus* by silver nanoparticles synthesized using green tea leaf extract


Atividade bactericida sinérgica contra MRSA e *S. aureus* de nanopartículas de prata sintetizadas com extrato de folhas de chá verde

Rasha Mohammed Sajet Al-Oqaili ¹ , Batool Abd Al Ameer Baqer ² , Huda Zuheir Majeed ¹ , Rebeca André ^{3,4} , Patricia Rijo ^{3,4,5} , Amr Hassan ⁶ , & Eman M. Sharaf ⁷ 

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *mecA*, *mecR1*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, silver nanoparticles

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, *mecA*, *mecR1*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, nanopartículas de prata

To Cite:

Al-Oqaili, R. M. S. (2026) Synergetic bactericide activity against MRSA and *S. aureus* by silver nanoparticles synthesized using green tea leaf extract. *BBR - Pharmacology & Technology*, 23, 375, 1-16.
 <https://doi.org/10.19277/bbr.pht.23.375>

1 - Department of Biology, College of Science, Al-Mustansiriyah University, Box 14022, Baghdad, Iraq

2 - Department of Microbiology, College of Science, Al-Mustansiriyah University, Box 14022, Baghdad, Iraq

3 - CBIOS - Lusófona University's Research Center for Biosciences and Health Technologies, 1749-024 Lisbon, Portugal

4 - Centro de Química Estrutural, Institute of Molecular Sciences, Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

5 - Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisbon, Portugal

6 - Department of Bioinformatics, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute (GEBRI), University of Sadat City, Sadat 32897, Egypt

7 - Department of Bacteriology, Immunology, and Mycology, Animal Health Research Institute (ARC), Shebin El Kom 32511, Egypt

Correspondence to / Correspondência a: stry@uomustansiriyah.edu.iq

Received / Recebido: 10/10/2025
Accepted / Aceite: 08/02/2026

Journal correspondence / Correspondência dos jornais: bbr@alies.pt

Abstract

The development of eco-friendly approaches for the synthesis of silver nanoparticles (Ag-NPs) has attracted growing interest due to their potential as antibacterial agents. In this study, Ag-NPs were synthesised via an eco-friendly approach using green tea leaf extract, which served as both a reducing agent and a stabiliser. The physicochemical characterisation of the Ag-NPs was carried out by X-ray diffraction, dynamic light scattering, UV-Vis spectroscopy and transmission electron microscopy, confirming the formation of nanoparticles with an average diameter of approximately 20 nm. The in vitro antibacterial potential of Ag-NPs was assessed via anti-biofilm activity assays, bacterial kill-time curves and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), followed by molecular analysis by RT-PCR to evaluate their effect on resistance-associated genes in *S. aureus* and MRSA, including the *mecA* gene. The results showed MIC values of 10.8 µg/mL and 9 µg/mL against *S. aureus* and MRSA, respectively. Notably, Ag-NPs effectively inhibited biofilm formation at concentrations as low as 4 µg/mL. Furthermore, gene expression analysis revealed downregulation of the *blaZ*, *blaR1*, *mecR1* and *mecA* genes, which are critical for bacterial growth and resistance mechanisms.

Resumo

O desenvolvimento de abordagens ecológicas para a síntese de nanopartículas de prata (Ag-NPs) tem despertado crescente interesse devido ao seu potencial como agentes antibacterianos. Neste estudo, as Ag-NPs foram sintetizadas através de uma abordagem ecológica utilizando extrato de folhas de chá verde, que atuou simultaneamente como agente redutor e estabilizante. A caracterização físico-química das Ag-NPs foi realizada por difração de raios X, dispersão dinâmica da luz, espectrometria UV-Vis e microscopia eletrónica de transmissão, confirmando a formação de nanopartículas com diâmetro médio de aproximadamente 20 nm. O potencial antibacteriano in vitro das Ag-NPs foi avaliado através de ensaios de atividade anti-biofilme, curvas de morte bacteriana ao longo do tempo (kill-time) e determinação da concentração mínima inibitória (MIC), seguido de análise molecular por RT-PCR para avaliar o seu efeito em genes associados à resistência em *S. aureus* e MRSA, incluindo o gene *mecA*. Os resultados demonstraram valores de MIC de 10,8 µg/mL e 9 µg/mL contra *S. aureus* e MRSA, respetivamente. Notavelmente, as Ag-NPs inibiram eficazmente a formação de biofilmes em concentrações tão baixas quanto 4 µg/mL. Além disso, a análise da expressão génica revelou uma regulação negativa (downregulation) dos genes *blaZ*, *blaR1*, *mecR1* e *mecA*, os quais são críticos para o crescimento bacteriano e para os mecanismos de resistência.

Introduction

Globally, antimicrobial resistance represents a major challenge for healthcare professionals. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are responsible for a significant proportion of hospital- and clinic-acquired infections, which may progress to severe conditions such as pneumonia and bacteraemia (1, 2).

These microorganisms can impair surgical wound healing due to their ability to form biofilms. Biofilm formation limits antibiotic penetration and reduces the accumulation of effective drug concentrations at the infection site, thereby compromising treatment efficacy and delaying the healing process (3,4).

Antibiotic resistance has prompted researchers to seek alternative approaches to combat the impact of resistant strains in both community and hospital settings (5). Nanomedicine is currently regarded as a promising technology for a range of medical applications (6,7). Over the last decade, inorganic nanomaterials have been recognised as promising agents for multiple applications, including medical applications, particularly in cancer therapy, as well as antimicrobial and antifungal agents. These materials exhibit high efficacy as anti-infective agents due to properties such as a large surface area and the ability to generate reactive oxygen species (8).

New nanomaterials have been used as antimicrobial candidates capable of suppressing and inhibiting multiple pathogenic bacteria, such as *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (9). In general, silver is an inorganic metal considered safe and low-toxicity, capable of acting against more than 650 diseases caused by various microorganisms (10,11). Silver nanoparticles (Ag-NPs) are classified as broad-spectrum antimicrobial agents due to their remarkable properties, including high catalytic activity, the ability to release free Ag⁺ ions, and high photocatalytic performance associated with surface plasmon effects, which favour electron separation processes (12,13).

Introdução

A nível mundial, a resistência aos antimicrobianos representa um grande desafio para os profissionais de saúde. O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) são responsáveis por uma proporção significativa das infeções adquiridas em hospitais e clínicas, as quais podem evoluir para condições graves, tais como pneumonia e bacteriemia (1, 2).

Estes microrganismos podem prejudicar a cicatrização de feridas cirúrgicas devido à sua capacidade de formar biofilmes. A formação de biofilmes limita a penetração dos antibióticos e reduz a acumulação de concentrações eficazes do fármaco no local da infeção, comprometendo assim a eficácia do tratamento e atrasando o processo de cicatrização (3,4).

A resistência aos antibióticos tem motivado os investigadores a procurar novas abordagens alternativas capazes de combater o efeito das estirpes resistentes presentes tanto na comunidade como em ambientes hospitalares (5). Atualmente, a nanomedicina é considerada uma tecnologia promissora para diversas aplicações no domínio médico (6,7). Na última década, os nanomateriais inorgânicos têm sido reconhecidos como agentes promissores para múltiplas aplicações, incluindo aplicações médicas, particularmente na terapia do cancro, bem como como agentes antimicrobianos e antifúngicos. Estes materiais apresentam elevada eficiência como agentes anti-infecciosos devido às suas propriedades, como a grande área superficial e a capacidade de induzir espécies reativas de oxigénio (8).

Novos nanomateriais têm sido utilizados como candidatos antimicrobianos capazes de suprimir e inibir bactérias patogénicas múltiplas, como *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (9). De forma geral, a prata é um metal inorgânico considerado seguro e com baixa toxicidade, capaz de atuar contra mais de 650 doenças causadas por diferentes microrganismos (10,11). As nanopartículas de prata (Ag-NPs) são classificadas como agentes antimicrobianos de largo espectro devido às suas propriedades notáveis, incluindo elevada atividade catalítica, capacidade de libertar iões Ag⁺ livres e elevado desempenho fotocatalítico associado aos efeitos plasmónicos de superfície, que favorecem processos de separação eletrónica (12,13).

Silver nanoparticles can be prepared by various methods, including biological and chemical methods (14). The chemical synthesis approach relies on specific reagents to produce Ag-NPs, such as cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium tetrahydridoborate (NaBH_4). Although this method enables the production of nanoparticles with controlled shape and size, it may adversely affect tissues due to the toxicity of some capping agents used for nanoparticles (15).

Interestingly, an alternative, environmentally friendly, and reliable approach to produce noble nanomaterials, such as gold and silver, involves the use of plant extracts. This approach offers several advantages compared to other biological methods, such as those using microorganisms. Among the limitations associated with the use of microorganisms in the synthesis of metallic nanoparticles are high costs, the need for aseptic conditions, the difficulty of large-scale cultivation, and the level of purity of the final product (16). Difficulty in controlling the shape of the synthesised nanoparticles can be an additional limitation of this approach (17).

Plant extracts, on the other hand, do not require strict standardised conditions, such as aseptic environments, nor the maintenance of biological cultures. Several studies have reported the synthesis of silver nanoparticles using different plant extracts, such as *Coffea arabica* (18) and *Olea europaea* (19).

The use of plant extracts for the synthesis of noble metal nanoparticles, such as Au-NPs and Ag-NPs, has the advantage of containing various phytochemicals with reducing properties, such as terpenoids, polyphenols, alkaloids, and proteins, which play a significant role in converting metal ions into metals in their elemental form (20,21). Furthermore, these phytochemicals can play a dual role, acting simultaneously as reducing agents for metal ions and as capping agents, thereby contributing to the stabilisation of the metal nanoparticles formed.

In the present study, silver nanoparticles were synthesised using green tea leaf extract, and their ability to inhibit the activity of MRSA and *Staphylococcus aureus* was subsequently evaluated.

Diversos métodos podem ser utilizados para a preparação de nanopartículas de prata, incluindo métodos biológicos e químicos (14). A abordagem de síntese química baseia-se na utilização de reagentes químicos específicos para produzir Ag-NPs com diferentes compostos, como brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e tetra-hidridoborato de sódio (NaBH_4). Embora este método permita obter nanopartículas com forma e tamanho controlados, pode apresentar efeitos adversos nos tecidos devido à toxicidade de alguns agentes utilizados como agentes de revestimento (*capping agents*) das nanopartículas (15).

De forma interessante, uma abordagem alternativa considerada ecológica e fiável para a produção de nanomateriais nobres, como ouro e prata, envolve a utilização de extratos vegetais. Esta abordagem apresenta diversas vantagens em comparação com outros métodos biológicos, como aqueles que utilizam microrganismos. Entre as limitações associadas ao uso de microrganismos na síntese de nanopartículas metálicas destacam-se os custos elevados, a necessidade de condições assépticas, a dificuldade de cultivo em larga escala e a pureza do produto final (16). Além disso, o uso de microrganismos pode apresentar limitações adicionais, como a dificuldade em controlar a forma das nanopartículas sintetizadas (17).

Os extratos vegetais, por sua vez, não requerem condições padronizadas rigorosas, como ambientes assépticos, nem a manutenção de culturas biológicas. Diversos estudos relataram a síntese de nanopartículas de prata utilizando diferentes extratos vegetais, como *Coffea arabica* (18) e *Olea europaea* (19).

A utilização de extratos vegetais para a síntese de nanopartículas de metais nobres, como Au-NPs e Ag-NPs, apresenta a vantagem de conter diferentes fitoquímicos com propriedades redutoras, como terpenoides, polifenóis, alcaloides e proteínas, os quais desempenham um papel significativo na conversão de iões metálicos em metais na sua forma elementar (20,21). Além disso, estes fitoquímicos podem desempenhar um papel duplo, atuando simultaneamente como agentes redutores dos iões metálicos e como agentes de revestimento (*capping agents*), contribuindo para a estabilização das nanopartículas metálicas formadas.

No presente trabalho, as nanopartículas de prata foram sintetizadas utilizando extrato de folhas de chá verde, sendo posteriormente avaliada a sua capacidade de inibir a atividade de MRSA e *Staphylococcus aureus*.

Materials and methods

Synthesis and characterisation

Silver nanoparticles (Ag-NPs) were synthesised using green tea extract via a reduction method. In summary, 10 g of green tea leaves were added to 100 mL of deionised water and heated for 15 minutes. The resulting extract was subsequently filtered through a 0.2 µm Millipore membrane. Next, 12 mL of the extract were added to 100 mL of a 1 mM silver nitrate solution at room temperature, and the mixture was left to stand until a colour change indicative of nanoparticle formation occurred.

The synthesised Ag-NPs were characterised by UV-Vis spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), zeta potential, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The nanoparticles were stored at 4 °C for later use (22).

In vitro antimicrobial investigation

The bacterial strains used in this study were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, both obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). All strains were cultured in Mueller-Hinton broth (MHB; Merck, Germany) at 37 °C for 24 h, with agitation at 200 rpm.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Assay

The MIC assay protocol was carried out in accordance with Sharaf et al. (23). In general, the bacterial strain under study was inoculated onto plates containing MHB broth. Subsequently, the test material included Ag-NPs and 25 µg of linezolid (LZD), used as a reference antibiotic (positive control) for *S. aureus* and MRSA, respectively. The test materials, at a concentration of 25 µg, were applied to paper discs in a volume of 30 µL, whilst a blank disc was used as the untreated sample (negative control). All discs were incubated for 24 h at room temperature (RT), and the diameter of the inhibition zone was subsequently measured (23).

Bacterial killing kinetics assay – Time-kill

The bacterial killing kinetics assay is considered a fundamental method for evaluating antibacterial agents as potential antimicrobial agents. Initially, the

Materiais e métodos

Síntese e caracterização

As nanopartículas de prata (Ag-NPs) foram sintetizadas utilizando extrato de chá verde através de um método de redução. De forma resumida, 10 g de folhas de chá verde foram adicionadas a 100 mL de água desionizada e aquecidas durante 15 minutos. O extrato obtido foi posteriormente filtrado através de uma membrana Millipore de 0,2 µm. Em seguida, 12 mL do extrato foram adicionados a 100 mL de uma solução de nitrato de prata 1 mM à temperatura ambiente, sendo a mistura mantida até ocorrer uma mudança de cor indicativa da formação de nanopartículas.

As Ag-NPs sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis, difração de raios X (XRD), potencial zeta, dispersão dinâmica da luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As nanopartículas foram armazenadas a 4 °C para utilização posterior (22).

Investigação antimicrobiana in vitro

As estirpes bacterianas utilizadas neste estudo foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) ATCC 33591, ambas obtidas da ATCC (Rockville, MD, EUA). Todas as estirpes foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton (MHB; Merck, Alemanha) a 37 °C durante 24 h, com agitação a 200 rpm.

Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)

O protocolo do ensaio de MIC foi realizado de acordo com Sharaf e colaboradores (23). De forma geral, a estirpe bacteriana em estudo foi inoculada em placas contendo caldo MHB. Posteriormente, o material em estudo incluiu Ag-NPs e 25 µg de linezolid (LZD), utilizada como antibiótico de referência (controle positivo) para *S. aureus* e MRSA, respetivamente. Os materiais em estudo foram aplicados em discos de papel com um volume de 30 µL a uma concentração de 25 µg, enquanto um disco em branco foi utilizado como amostra não tratada (controle negativo). Todos os discos foram incubados durante 24 h à temperatura ambiente (RT), sendo posteriormente determinado o diâmetro da zona de inibição após o período de incubação (23).

Ensaio de cinética de morte bacteriana - Time-kill

O ensaio de cinética de morte bacteriana é considerado um método fundamental para avaliar agentes antibacterianos como potenciais materiais

MIC of Ag-NPs was determined using the microdilution method. In summary, 10^6 colony-forming units (CFU)/mL of *S. aureus* and MRSA were inoculated onto a microtitre plate. The bacterial inocula were diluted twice using a stock solution of Ag-NPs (500 μ M/mL) prepared in 100 mL of MHB. Subsequently, a resazurin solution was added to each well, and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. A colour change in resazurin, from blue or purple to pink, was considered evidence of bacterial growth (24).

ATPase activity assay

The inhibition of *S. aureus* and MRSA by silver nanoparticles was assessed in the presence of the ATPase inhibitor N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), using standard methods (25). The principle of this assay is based on the release of inorganic phosphate (Pi) when 3 mM ATP is added to the membrane.

The bacteria were analysed in the presence of Ag-NPs at a concentration of 10 μ g/mL. The membrane vesicles were incubated with 0.2 mM DCCD for 10 minutes (25).

Anti-biofilm activity of Ag-NPs

As biofilm formation contributes to antibiotic resistance, the ability of the prepared Ag-NPs to prevent biofilm formation was examined. The protocol was based on diluting the selected bacterial strains at a ratio of 1:100 in nutrient broth. Next, 100 μ L of the diluted mixture was pipetted and transferred to a new tube, and the sample was agitated in a rotary shaker set at 70 rpm. Subsequently, the planktonic bacteria were removed by washing with sterile saline solution (0.9% w/v). The resulting biofilm was then exposed to serial dilutions of the test material (Ag-NPs), in a concentration range of 1 to 32 μ g/mL. The samples were incubated at room temperature on a rotary shaker for 24 h. Bacterial viability was determined using the AlamarBlue cell viability assay (26).

Reverse Transcription-PCR

The effect of Ag-NPs on the expression of resistance-associated genes *mecA*, *mecR1*, *blaR1*, and *blaZ* was examined by RT-PCR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *S. aureus* were inoculated into MHB (0.9) medium and exposed to sub-inhibitory concentrations of Ag-NPs for 30 minutes. A control group without the test material was included. Total

antimicrobianos. Inicialmente, a MIC das Ag-NPs foi determinada através do método de microdiluição. De forma resumida, 10^6 unidades formadoras de colónias (CFU)/mL de *S. aureus* e MRSA foram inoculadas numa placa de microtitulação. Os inóculos bacterianos foram diluídos duas vezes utilizando uma solução stock de Ag-NPs (500 μ M/mL) preparada em 100 mL de MHB. Posteriormente, foi adicionada uma solução de resazurina a cada poço, sendo as placas incubadas a 37 °C durante 24 h. A alteração de cor da resazurina, de azul ou roxo para rosa, foi considerada evidência da presença de crescimento bacteriano (24).

Ensaio de atividade ATPase

A inibição de *S. aureus* e MRSA pelas nanopartículas de prata foi avaliada na presença do inibidor de ATPase N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCCD), utilizando métodos padrão (25). O princípio deste ensaio baseia-se na libertação de fosfato inorgânico (Pi) quando 3 mM de ATP são adicionados à membrana.

As bactérias foram analisadas na presença de Ag-NPs a uma concentração de 10 μ g/mL. As vesículas de membrana foram incubadas com 0,2 mM de DCCD durante 10 minutos (25).

Atividade Anti-biofilme das Ag-NPs

Uma vez que a formação de biofilmes contribui para a resistência aos antibióticos, foi analisada a capacidade das Ag-NPs preparadas para impedir a formação de biofilmes. O protocolo baseou-se na diluição das estirpes bacterianas selecionadas numa proporção de 1:100 em caldo nutritivo. Em seguida, foram pipetados 100 μ L da mistura diluída e transferidos para um novo tubo, sendo a amostra agitada num agitador rotativo ajustado a 70 rpm. Posteriormente, as bactérias planctónicas foram removidas através de lavagem com solução salina estéril (0,9% p/v). Seguidamente, o biofilme formado foi exposto a diluições seriadas do material em estudo (Ag-NPs), numa gama de concentrações entre 1 e 32 μ g/mL. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente num agitador rotativo durante 24 h. A viabilidade bacteriana foi determinada através do ensaio de viabilidade celular AlamarBlue (26).

Transcrição Reversa-PCR

O efeito das Ag-NPs na expressão dos genes associados à resistência *mecA*, *mecR1*, *blaR1* e *blaZ* foi analisado por RT-PCR. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *S. aureus* foram inoculados em meio MHB (0,9) e expostos a concentrações sub-inibitórias de Ag-NPs durante 30 minutos. Foi incluído um controlo

Table 1 - Primers used in quantitative RT-PCR (qRT-PCR).**Tabela 1** - Primers utilizados na RT-PCR quantitativa (qRT-PCR).

Primer	Sequence (5'-3')
16S RNA	F:ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
	R:ATTACCGCGGCTGCTGG
mecA	F:CAATGCCAAAATCTCAGGTAAAGTG
	R:AACCATCGTTACGGATTGCTTC
mecR1	F:GTGCTCGTCTCCACGTTAATTCCA
	R:GACTAACCGAAGAAGTCGTGTCAG
blaR1	F:CACTATTCTCAGAATGACTTGGT
	R:GACTAACCGAAGAAGTCGTGTCAG
blaZ	F:GCTTTAAAAGAACTTATTGAGGCTTC
	R:CCACCGATYTCKTTTATAATTT

RNA was extracted using an RNA extraction kit, in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, CA, USA). The primers were commercially purchased from Bioneer (Daejeon, Korea), as previously described by Wang et al. (26), and are listed in Table 1.

Statistical analysis

All assays were performed independently in triplicate, with results presented as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance was assessed using Student's *t*-test in SPSS version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant for *p*-values < 0.05 (27).

Results

Characterisation of the nanoparticles

The synthesised silver nanoparticles (Ag-NPs) were characterised using a combination of spectroscopic, diffraction and microscopic techniques to confirm their formation, size, stability and morphology.

The UV-visible spectrum showed a plasmonic absorption peak (λ_{max}) around 450 nm, indicating the formation of Ag-NPs, as shown in Figure 1A.

The crystal lattice of the Ag-NPs was investigated by X-ray diffraction (XRD). The X-ray diffraction pattern of the silver nanoparticles, shown in Figure 1B,

sem material em estudo. O RNA total foi extraído utilizando um kit de extração de RNA, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Os primers foram adquiridos comercialmente à Bioneer (Daejeon, Coreia do Sul), conforme descrito anteriormente por Wang et al. (26), e encontram-se apresentados na Tabela 1.

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados de forma independente em triplicado, sendo os resultados apresentados como média \pm desvio padrão (SD). A significância estatística foi avaliada utilizando o teste *t* de Student no software SPSS versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de *p* $< 0,05$ (27).

Resultados

Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de prata sintetizadas (Ag-NPs) foram caracterizadas utilizando uma combinação de técnicas espectroscópicas, de difração e microscópicas, de modo a confirmar a sua formação, tamanho, estabilidade e morfologia.

O espectro UV-visível apresentou um pico de absorção plasmônica (λ_{max}) em torno de 450 nm, indicando a formação de Ag-NPs, como apresentado na Figura 1A.

A rede cristalina das Ag-NPs foi investigada por difração de raios X (XRD). O padrão de difração de raios X das nanopartículas de prata, apresentado na

displays peaks at $2\theta = 35.634^\circ$, 43.415° and 65.264° , corresponding to the crystallographic planes (111), (220) and (400), respectively. These results are in agreement with the silver diffraction pattern described in JCPDS entry JCPDS-4-0783.

Dynamic light scattering (DLS) results demonstrated that the average size of the silver nanoparticles was approximately 20 nm, as shown in Figure 1C. The zeta potential of the silver nanoparticles was -20 mV (Figure 1D), indicating good colloidal stability of the nanoparticles.

The morphology and shape of the Ag-NPs were determined by transmission electron microscopy (TEM). As shown in Figure 2, the TEM image revealed spherical nanoparticles with an approximate diameter of 20 nm, confirming the formation of silver nanoparticles with a regular morphology and the absence of aggregation.

Figura 1B, mostra picos em $2\theta = 35,634^\circ$, $43,415^\circ$ e $65,264^\circ$, correspondentes aos planos cristalográficos (111), (220) e (400), respetivamente. Estes resultados estão em concordância com o padrão de difração da prata descrito na ficha JCPDS-4-0783.

Os resultados de dispersão dinâmica da luz (DLS) demonstraram que o tamanho médio das nanopartículas de prata foi de aproximadamente 20 nm, conforme apresentado na Figura 1C. O potencial zeta das nanopartículas de prata apresentou um valor de -20 mV (Figura 1D), indicando boa estabilidade coloidal das nanopartículas.

A morfologia e a forma das Ag-NPs foram determinadas por microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Como apresentado na Figura 2, a imagem TEM evidenciou nanopartículas de forma esférica com diâmetro aproximado de 20 nm, confirmando a formação de nanopartículas de prata com morfologia regular e ausência de agregação.

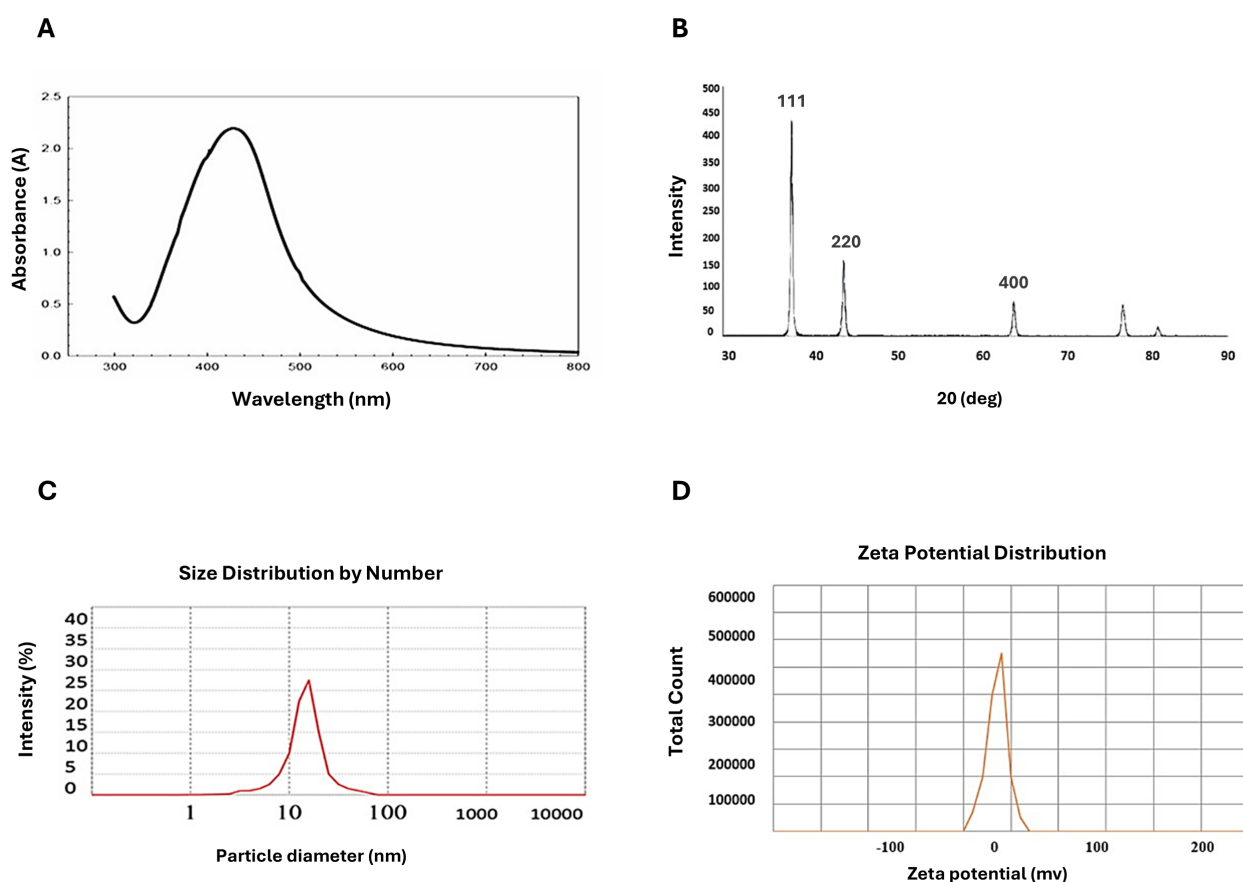


Figure 1 - Characterisation of silver nanoparticles (Ag-NPs) by: (A) UV-Visible spectra; (B) X-ray diffraction (XRD); (C) Dynamic Light Scattering (DLS); (D) Zeta potential

Figura 1 - Caracterização das nanopartículas de prata (Ag-NPs) através de: (A) Espectros UV-Vis; (B) Difração de raios X (XRD); (C) Dispersão dinâmica da luz (DLS); (D) Potencial Zeta

Table 2 - MIC values of silver nanoparticles and Linezolid against *S. aureus* and MRSA**Tabela 2** - Valor da MIC das nanopartículas de prata e da linezolidina contra *S. aureus* e MRSA

Test material	Linezolid (LZD)	Ag-NPs MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	7.3 \pm 0.03	10.8 \pm 0.01
MRSA (ATCC 33591)	6.9 \pm 0.02	9.0 \pm 0.01

Antibacterial activity

The antibacterial potential of the Ag-NPs was evaluated against MRSA and *S. aureus* by analysing bacterial growth kinetics in the presence of the nanoparticles. As shown in Table 2, the Ag-NPs inhibited the growth of both bacterial strains, with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 10.8 $\mu\text{g/mL}$ for *S. aureus* and 9 $\mu\text{g/mL}$ for MRSA. For comparison, the MIC values for linezolid, used as a positive control, were 7.3 $\mu\text{g/mL}$ and 6.9 $\mu\text{g/mL}$ against *S. aureus* and MRSA, respectively.

Bacterial killing kinetics assay - Time-kill

Time-kill assays indicate the bactericidal activity of the tested material. Figure 3A shows the activity of silver nanoparticles against *S. aureus*, revealing a reduction of more than 95% in the number of colony-forming units (CFU/mL) (log units) with upon exposure. For *S. aureus*, the bactericidal effect occurred after 2 hours of incubation at 21.6 $\mu\text{g/mL}$ (2 \times MIC) and 43.2 $\mu\text{g/mL}$ (4 \times MIC). Similarly, the killing kinetics of Ag-NPs against MRSA reached a 95% reduction after 2 hours at 18 $\mu\text{g/mL}$ (2 \times MIC) and 36 $\mu\text{g/mL}$ (4 \times MIC), as shown in Figure 3B. These results emphasise that Ag-NPs are effective against both *S. aureus* and MRSA strains.

Atividade antibacteriana

O potencial antibacteriano das Ag-NPs foi avaliado contra MRSA e *S. aureus* através da análise da cinética de crescimento bacteriano na presença das nanopartículas. Como apresentado na Tabela 2, as Ag-NPs inibiram o crescimento de ambas as estirpes bacterianas, apresentando valores de concentração mínima inibitória (MIC) de 10,8 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* e 9 $\mu\text{g/mL}$ para MRSA. Para comparação, os valores de MIC da linezolidina, utilizada como controlo positivo, foram de 7,3 $\mu\text{g/mL}$ e 6,9 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* e MRSA, respetivamente.

Ensaio de cinética de morte bacteriana - Time-kill

Time-kill assays indicate the bactericidal activity of the tested material. Figure 3A shows the activity of silver nanoparticles against *S. aureus*, revealing a reduction of more than 95% in Colony-Forming Unit CFU/mL (log units) upon exposure. For *S. aureus*, the bactericidal effect occurred after 2 hours of incubation at 21.6 $\mu\text{g/mL}$ (2 \times MIC) and 43.2 $\mu\text{g/mL}$ (4 \times MIC). Similarly, the killing kinetics of Ag-NPs against MRSA reached a 95% reduction after 2 hours at 18 $\mu\text{g/mL}$ (2 \times MIC) and 36 $\mu\text{g/mL}$ (4 \times MIC), as shown in Figure 3B. These results emphasize that Ag-NPs are effective against both *S. aureus* and MRSA strains.

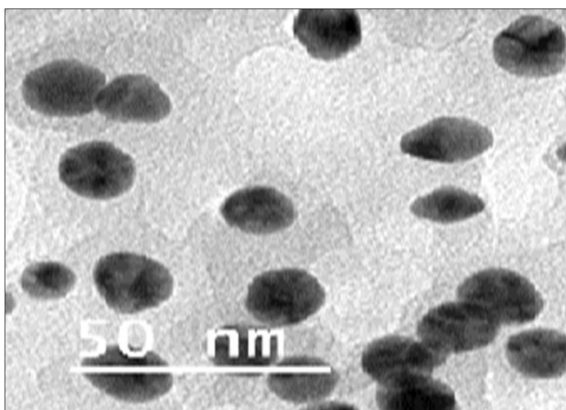


Figure 2 - Transmission electron microscopy (TEM) of silver nanoparticles

Figura 2 - Microscopia eletrónica de transmissão (TEM) das nanopartículas de prata.

Efficacy of Ag-NPs against biofilms

Biofilm formation is one of the main factors reducing the efficacy of antibiotics. In this study, we evaluated the ability of silver nanoparticles to inhibit bacterial biofilm formation.

As shown in Figure 4, Ag-NPs inhibited biofilm formation by *S. aureus* and MRSA across a range of concentrations between 1 µg/mL and 32 µg/mL. The most effective concentration for preventing biofilm development in both strains was 4 µg/mL.

ATPase activity assay

The function of ATP synthase plays an important role in the physiology of *S. aureus*, influencing membrane hyperpolarisation and sensitivity to polymyxins. The bactericidal effect of Ag-NPs was investigated through their interaction with different

Eficiência das Ag-NPs contra biofilmes

A formação de biofilmes é um dos principais fatores que reduzem a eficácia dos antibióticos. Neste estudo, avaliamos a capacidade das nanopartículas de prata para inibir a formação de biofilmes bacterianos.

Como apresentado na Figura 4, as Ag-NPs inibiram a formação de biofilmes por *S. aureus* e MRSA numa gama de concentrações entre 1 µg/mL e 32 µg/mL. A concentração mais eficaz para prevenir o desenvolvimento de biofilmes em ambas as estirpes foi de 4 µg/mL.

Ensaio de atividade ATPase

A função da ATP sintase desempenha um papel importante na fisiologia de *S. aureus*, influenciando a hiperpolarização da membrana e a sensibilidade a polimixinas. O efeito bactericida das Ag-NPs foi

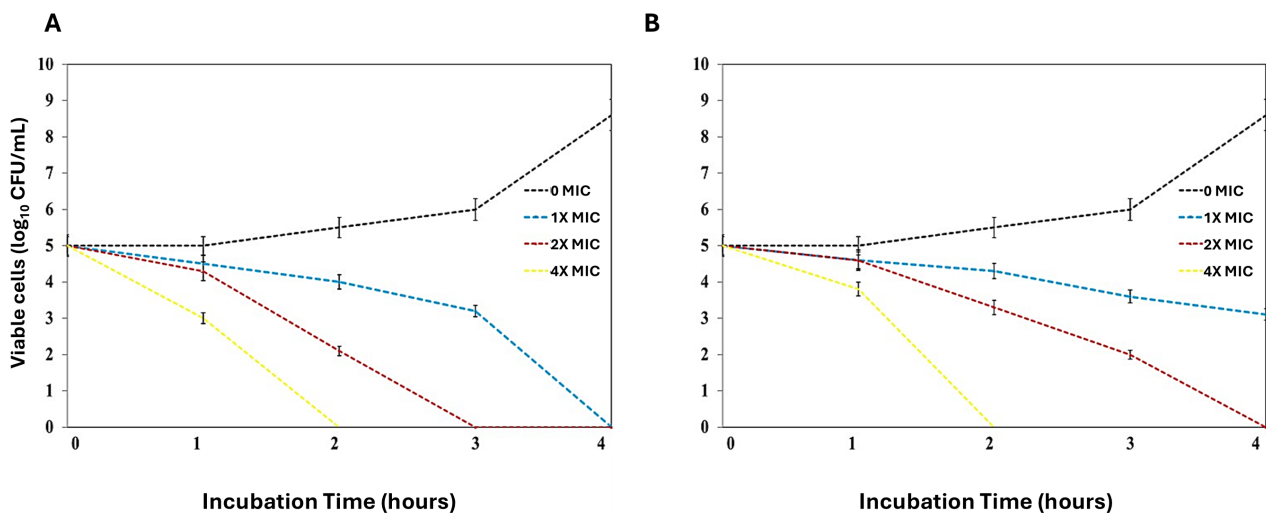
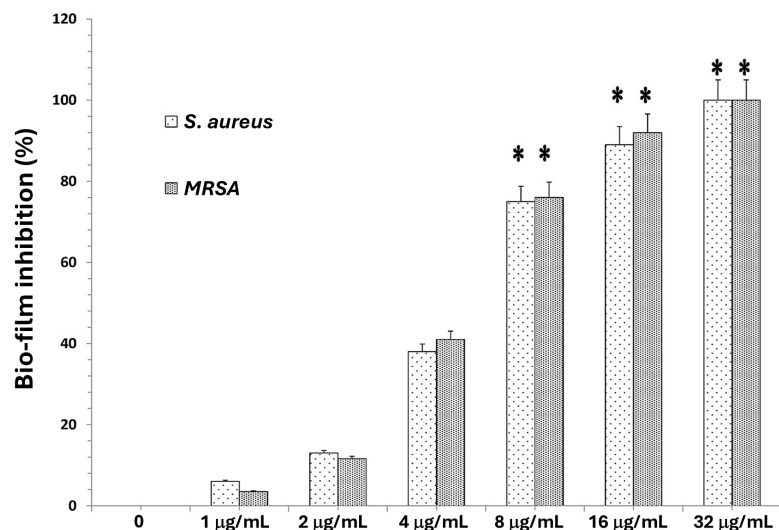


Figure 3 - (A) Inhibition zone of Ag-NPs against *S. aureus*; (B) Inhibition zone against MRSA.
Figura 3 - (A) Zona de inibição das Ag-NPs contra *S. aureus*; (B) Zona de inibição contra MRSA.

Figure 4 - Effect of Ag-NP concentrations (µg/mL) on the viability of *S. aureus* and MRSA biofilms compared with the control without Ag-NP treatment (n = 3; p < 0.05).

Figura 4 - Efeito das concentrações de Ag-NPs (µg/mL) na viabilidade de biofilmes de *S. aureus* e MRSA em comparação com o controlo sem tratamento com Ag-NPs (n = 3; p < 0,05).



inhibitors (Figure 5). The results demonstrated that Ag-NPs reduced ATPase activity by 40% for *S. aureus* and by 37% for MRSA. These results suggest that interference with bacterial energy metabolism may contribute to the biocidal activity of silver nanoparticles.

Influence of Ag-NPs on resistance-related genes in S. aureus and MRSA

The expression of *blaZ*, *blaR1*, *mecA*, and *mecR1* genes was downregulated in *S. aureus* and MRSA samples after treatment with 1/8 MIC (1.125 and 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MRSA and *S. aureus*, respectively) concentrations of Ag-NPs, and the expression of the four genes was influenced by the exposure to the effective concentrations, as shown in Figure 6. In the presence of 1/2 MIC of Ag-NPs (4.5 and 5.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MRSA and *S. aureus*, respectively), the expression levels of the *blaZ*, *blaR1*, *mecA*, and *mecR1* genes were reduced 1.9, 2.6, 2.7, and 2.6 times, respectively.

Discussion

Antibiotic resistance currently represents one of the major global challenges in public health, particularly due to bacteria such as MRSA and *S. aureus*. As discussed, biofilm formation limits the penetration of antibiotics and reduces the accumulation of effective drug concentrations throughout the biofilm structure, thereby compromising therapeutic efficacy (28). These biofilms increase bacterial resistance to antibiotic therapy through multiple mechanisms, dependent on factors such as the composition, architecture of the biofilm and bacterial growth conditions.

investigado através da sua interação com diferentes inibidores (Figura 5). Os resultados demonstraram que as Ag-NPs reduziram a atividade ATPase em 40% para *S. aureus* e em 37% para MRSA. Estes resultados sugerem que a interferência no metabolismo energético bacteriano pode contribuir para a atividade biocida das nanopartículas de prata.

Influência das Ag-NPs nos genes responsáveis pela resistência em S. aureus e MRSA

Conforme ilustrado na Figura 6, a expressão dos genes *blaZ*, *blaR1*, *mecA* e *mecR1* foi regulada negativamente (*downregulation*) em amostras de *S. aureus* e MRSA após tratamento com concentrações de Ag-NPs equivalentes a 1/8 da MIC (1,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para MRSA e 1,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus*). Na presença de 1/2 MIC de Ag-NPs (4,5 e 5,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para MRSA e *S. aureus*, respectivamente), os níveis de expressão dos genes *blaZ*, *blaR1*, *mecA* e *mecR1* foram reduzidos em 1,9; 2,6; 2,7; e 2,6 vezes, respectivamente.

Discussão

A resistência aos antibióticos representa atualmente um dos principais desafios globais na saúde pública, particularmente devido a bactérias como o MRSA e o *S. aureus*. Conforme discutido, a formação de biofilmes limita a penetração dos antibióticos e reduz a acumulação de concentrações eficazes do fármaco em toda a estrutura do biofilme, comprometendo assim a eficácia terapêutica (28). Estes biofilmes aumentam a resistência bacteriana à terapia antibiótica através de múltiplos mecanismos, dependentes de fatores como a composição, a arquitetura do biofilme e as condições de crescimento bacteriano.

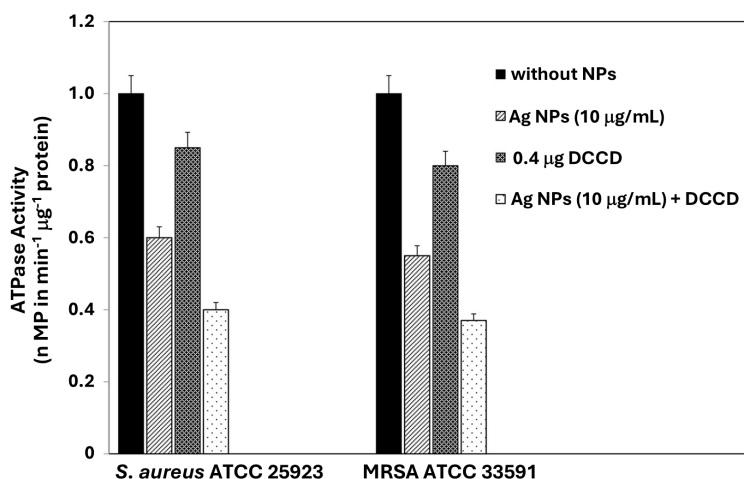


Figure 5 - Effect of Ag-NPs on the membrane ATPase activity of *S. aureus* and MRSA in the presence of DCCD (0.4 μg)

Figura 5 - Efeito das Ag-NPs na atividade ATPase da membrana de *S. aureus* e MRSA na presença de DCCD (0,4 μg).

The intermolecular interactions present in biofilms, including hydrogen bonds and van der Waals forces, promote bacterial adhesion to surfaces and significantly reduce the activity of conventional antibiotics. The ability of bacteria to form biofilms on medical surfaces or host tissues constitutes a critical problem, as these act as protective barriers that limit antibiotic penetration and promote resistance mechanisms (2). Nanomedicine has emerged as a promising strategy for bactericidal applications due to its unique properties, including high surface area, small particle size and the ability to inhibit various pathogenic microorganisms (29).

As interações intermoleculares presentes nos biofilmes, incluindo ligações de hidrogénio e forças de van der Waals, promovem a adesão bacteriana às superfícies e reduzem significativamente a atividade dos antibióticos convencionais. A capacidade das bactérias de formar biofilmes em superfícies médicas ou tecidos do hospedeiro constitui um problema crítico, uma vez que estes atuam como barreiras protetoras que limitam a penetração dos antibióticos e promovem mecanismos de resistência (2). A nanomedicina surgiu como uma estratégia promissora para aplicações bactericidas devido às suas propriedades únicas, incluindo elevada área superficial, tamanho reduzido das partículas e a capacidade de inibir vários microrganismos patogénicos (29).

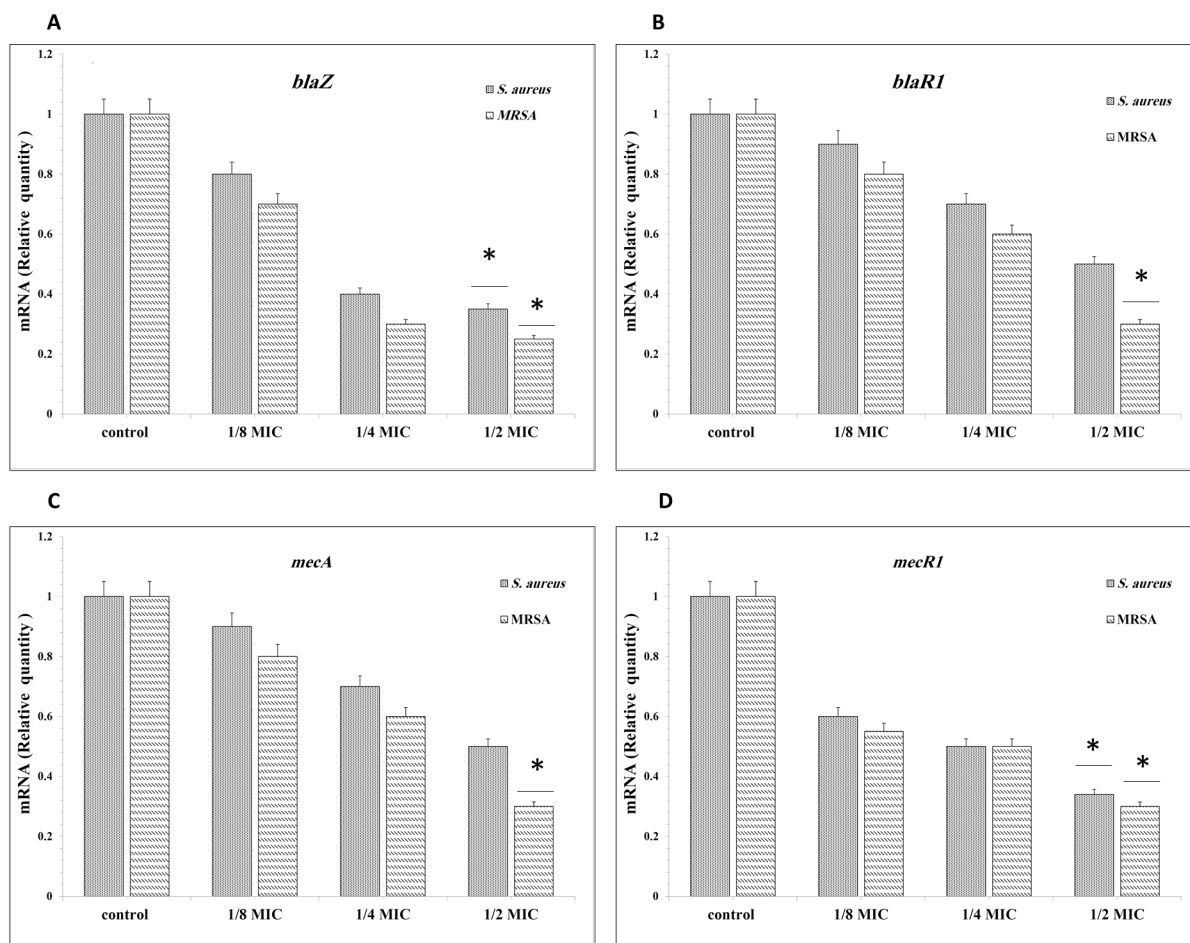


Figure 6 - Gene expression of (A) *blaR1*, (B) *mecA*, (C) *blaZ*, and (D) *mecR1* in MRSA and *S. aureus* following inoculation with different concentrations of Ag-NPs. * indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) between *S. aureus* and MRSA at the same concentration. Control: untreated *S. aureus* and MRSA.

Figure 6 - Expressão génica de (A) *blaR1*, (B) *mecA*, (C) *blaZ*, e (D) *mecR1* em MRSA e *S. aureus* após inoculação com diferentes concentrações de Ag-NPs. * indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre *S. aureus* e MRSA na mesma concentração. Controlo: *S. aureus* e MRSA não tratados.

Green synthesis is an environmentally friendly approach to producing nanometals, as it utilises biocompatible natural products and reduces reliance on potentially toxic reagents (30). Previous studies have demonstrated, for example, the use of *Berberis vulgaris* fruit extract in the synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria, including *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* (31). Similarly, extracts from *Kalanchoe pinnata* leaves were used to synthesise Ag-NPs with an average size of 38 nm, which demonstrated bactericidal activity against *E. coli* (32).

Although these studies confirm the antimicrobial potential of Ag-NPs synthesised from plant extracts, most research focuses primarily on activity against planktonic cells, with fewer studies addressing biofilm inhibition or the molecular mechanisms associated with resistance. The antimicrobial activity of Ag-NPs depends heavily on concentration, as well as on the size of the nanoparticles, the phytochemical composition of the plant extract, and the bacterial strain evaluated.

In the present study, the Ag-NPs synthesised from green tea extract were spherical in shape, with an average size of 20–25 nm and no aggregation.

MIC assays demonstrated strong antibacterial activity against *S. aureus* (10.8 µg/mL) and MRSA (9 µg/mL). Time-kill assays demonstrated that concentrations of 2×MIC and 4×MIC caused reductions of over 95% in CFU/mL after just 2 hours of incubation, indicating a rapid bactericidal effect.

Furthermore, anti-biofilm assays demonstrated that Ag-NPs inhibited biofilm formation by more than 80% at a concentration of 8 µg/mL, with 4 µg/mL being the minimum concentration capable of completely preventing biofilm formation. Another important finding was the reduction in ATPase activity by 40% for *S. aureus* and 37% for MRSA, suggesting that disruption of bacterial energy metabolism contributes to the observed antimicrobial effect.

Ag-NPs reduced the expression of multiple genes involved in β-lactam resistance, including *mecA*, *mecR1*, *blaZ*, and *blaR1* indicating interference with both resistance mechanisms and their regulatory pathways (35,36).

A síntese verde é uma abordagem ecológica para a produção de nanometais, uma vez que utiliza produtos naturais biocompatíveis e reduz a dependência de reagentes potencialmente tóxicos (30). Estudos anteriores demonstraram, por exemplo, a utilização do extrato do fruto de *Berberis vulgaris* na síntese de nanopartículas de prata com atividade antibacteriana contra bactérias multirresistentes, incluindo *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* (31). De forma semelhante, foram utilizados extratos de folhas de *Kalanchoe pinnata* para sintetizar Ag-NPs com um tamanho médio de 38 nm, que demonstraram atividade bactericida contra *E. coli* (32).

Embora estes estudos confirmem o potencial antimicrobiano das Ag-NPs sintetizadas a partir de extratos vegetais, a maioria das investigações centra-se principalmente na atividade contra células planctónicas, sendo menos numerosos os estudos que abordam a inibição de biofilmes ou os mecanismos moleculares associados à resistência. A atividade antimicrobiana das Ag-NPs depende fortemente da concentração, bem como do tamanho das nanopartículas, da composição fitoquímica do extrato vegetal e da estirpe bacteriana avaliada.

No presente estudo, as Ag-NPs sintetizadas a partir do extrato de chá verde apresentavam forma esférica, com um tamanho médio de 20–25 nm e sem agregação.

Os ensaios de CMI demonstraram forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* (10,8 µg/mL) e MRSA (9 µg/mL). Os ensaios de tempo de morte demonstraram que concentrações de 2×CMI e 4×CMI causaram reduções superiores a 95% em UFC/mL após apenas 2 horas de incubação, indicando um efeito bactericida rápido.

Além disso, os ensaios antibiofilme demonstraram que as Ag-NPs inibiram a formação de biofilme em mais de 80% a uma concentração de 8 µg/mL, sendo 4 µg/mL a concentração mínima capaz de impedir completamente a formação de biofilme. Outra descoberta importante foi a redução da atividade da ATPase em 40% para o *S. aureus* e em 37% para o MRSA, sugerindo que a perturbação do metabolismo energético bacteriano contribui para o efeito antimicrobiano observado.

As Ag-NPs reduziram a expressão de múltiplos genes envolvidos na resistência aos β-lactâmicos, incluindo *mecA*, *mecR1*, *blaZ* e *blaR1*, indicando interferência tanto nos mecanismos de resistência como nas suas vias reguladoras (35,36).

Overall, these results demonstrate that green-synthesised Ag-NPs exhibit strong antibacterial activity against MRSA and *S. aureus*, combining inhibition of bacterial growth, suppression of biofilm formation and modulation of resistance-associated genes.

Conclusion

Bacterial infections and antibiotic resistance remain major challenges for healthcare systems worldwide. One of the principal factors contributing to bacterial resistance is the formation of biofilms, which protect bacteria from conventional treatments. Consequently, alternative strategies, including bio-nanotechnology approaches, have been explored to combat resistant bacteria.

In this study, silver nanoparticles (Ag-NPs) were synthesised using green tea extract as a reducing agent. Physicochemical characterisation by DLS, UV-Vis spectroscopy and TEM confirmed the formation of spherical nanoparticles with an approximate diameter of 20 nm.

The synthesised Ag-NPs exhibited strong antibacterial activity against *S. aureus* and MRSA, as demonstrated by low MIC values and rapid bactericidal effects. Furthermore, Ag-NPs significantly reduced the expression of resistance-related genes (*mecA*, *mecR1*, *blaR1*, and *blaZ*), providing insight into their potential mechanism of action.

Taken together, this study demonstrates that green-synthesised Ag-NPs are promising antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens, combining antibacterial, anti-biofilm and resistance-modulating effects.

Em geral, estes resultados demonstram que as Ag-NPs sintetizadas de forma ecológica exibem forte atividade antibacteriana contra o MRSA e o *S. aureus*, combinando a inibição do crescimento bacteriano, a supressão da formação de biofilmes e a modulação de genes associados à resistência.

Conclusão

As infecções bacterianas e a resistência aos antibióticos continuam a ser grandes desafios para os sistemas de saúde em todo o mundo. Um dos principais fatores que contribuem para a resistência bacteriana é a formação de biofilmes, que protegem as bactérias dos tratamentos convencionais. Consequentemente, têm sido exploradas estratégias alternativas, incluindo abordagens de bio-nanotecnologia, para combater bactérias resistentes.

Neste estudo, foram sintetizadas nanopartículas de prata (Ag-NPs) utilizando extrato de chá verde como agente redutor. A caracterização físico-química por DLS, espectroscopia UV-Vis e TEM confirmou a formação de nanopartículas esféricas com um diâmetro aproximado de 20 nm.

As Ag-NPs sintetizadas exibiram forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* e MRSA, conforme demonstrado pelos baixos valores de CMI e pelos rápidos efeitos bactericidas. Além disso, as Ag-NPs reduziram significativamente a expressão de genes relacionados com a resistência (*mecA*, *mecR1*, *blaR1* e *blaZ*), fornecendo informações sobre o seu potencial mecanismo de ação.

Em conjunto, este estudo demonstra que as Ag-NPs sintetizadas por via ecológica são agentes antimicrobianos promissores contra patógenos multirresistentes, combinando efeitos antibacterianos, antibiofilme e de modulação da resistência.

Authors' Contribution

Conceptualisation: R.M.S.A.Q. and E.M.S.; formal analysis: B.A.A.A.A.B., E.M.S. and A.H.; research: H.Z.M, R.M.S.A.Q, B.A.A.A.A.B, and E.M.S.; methodology: E.M.S, and A.H; project and resource management: E.M.S. and R.M.S.A.Q.; supervision: R.M.S.A.Q.; validation: E.M.S.; visualisation: E.M.S.; drafting—original version: A.H. and E.M.S.; drafting—revision and editing: A.H., E.M.S., R.A. and P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Conflict of Interest

During the study, the authors confirmed that there were no corporate or financial relations that may be believed to pose a potential conflict of interest. The editor involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process.

Contribuição dos Autores

Conceptualização: R.M.S.A.Q, e E.M.S ; análise formal: B.A.A.A.A.B.,E.M.S, e A.H; investigação: H.Z.M, R.M.S.A.Q, B.A.A.A.A.B, e E.M.S.; metodologia: E.M.S, e A.H; administração do projeto e recursos: E.M.S. e R.M.S.A.Q.; supervisão: R.M.S.A.Q.; validação: E.M.S.; visualização: E.M.S.; redação—versão original: A.H, e E.M.S; redação—revisão e edição A.H., E.M.S., R.A e P.R. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Declaração de Conflito de Interesses

Durante a realização do estudo, os autores confirmaram que não existiram relações comerciais ou financeiras que possam ser consideradas como um potencial conflito de interesses. A editora envolvida na autoria deste manuscrito não participou no processo de revisão ou decisão.

References / Referências

1. Abalkhail, A., & Marzouk, E. (2025). Healthcare-associated infections: an overview of global strategies and challenges in minimizing infection transmission. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 71(10), 7–16. <https://doi.org/10.14715/cmb/2025.71.10.2>
2. Rezaei, A. R., Zienkiewicz, D., & Rezaei, A. R. (2025). Surgical site infections: a comprehensive review. *Journal of trauma and injury*, 38(2), 71–81. <https://doi.org/10.20408/jti.2025.0019>
3. Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2020). Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(1), 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
4. Azeem, K., Fatima, S., Ali, A., Ubaid, A., Husain, F. M., & Abid, M. (2025). Biochemistry of Bacterial Biofilm: Insights into Antibiotic Resistance Mechanisms and Therapeutic Intervention. *Life*, 15(1), 49. <https://doi.org/10.3390/life15010049>
5. Widatalla, H. A., Yassin, L. F., Alrasheid, A. A., Ahmed, S. A., Widdatallah, M. O., Etilib, S. H., & Mohamed, A. A. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using green tea leaf extract, characterisation and evaluation of antimicrobial activity. *Nanoscale Advances*, 4(17), 3647–3648. <https://doi.org/10.1039/d1na00509j>
6. Rijo, P., Abuamara, T. M., Ali Lashin, L. S., Kamar, S. A., Isca, V. M., Mohammed, T. S. & Hassan, A. (2024). Glycyrrhizic acid nanoparticles subside the activity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by suppressing PBP2a. *Pharmaceuticals*, 17(5), 589. <https://doi.org/10.3390/ph17050589>
7. Hassan, A., Rijo, P., Abuamara, T. M., Ali Lashin, L. S., Kamar, S. A., Bangay, G., ... & Abd El Maksoud, A. I. (2024). Synergistic differential DNA demethylation activity of danshensu (*Salvia miltiorrhiza*) associated with different probiotics in non-alcoholic fatty liver disease. *Biomedicines*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12020279>
8. Hu, W., Zhang, L., Tan, Y., Luo, J., Xin, J., Zhang, G., ... & Mao, C. (2024). Complexes of bacteria-recognising engineered phage lysin and red-coloured bacterial microparticles as optical bioprobes for simple, rapid, naked-eye detection of syphilis-specific antibodies from clinical samples. *View*, 5(4), 20230120. <https://doi.org/10.1002/VIW.20230120>
9. Han, H., Yang, J., Li, X., Qi, Y., Yang, Z., Han, Z., Jiang, Y., Stenzel, M., Li, H., Yin, Y., Du, Y., Liu, J., & Wang, F. (2021). Shining light on transition metal sulfides: New choices as highly efficient antibacterial agents. *Nano research*, 14(8), 2512–2534. <https://doi.org/10.1007/s12274-021-3293-3>
10. Rai, M., Ingle, A. P., Birla, S., Yadav, A., & Santos, C. A. D. (2016). Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(5), 696–719. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1018131>
11. Scandorieiro, S., De Camargo, L. C., Lancheros, C. A., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., De Oliveira, A. G., ... & Kobayashi, R. K. (2016). Synergistic and additive effect of regano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in microbiology*, 7, 760. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00760>
12. Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2555. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
13. Xu, R., Ma, J., Sun, X., Chen, Z., Jiang, X., Guo, Z. & Gu, N. (2009). Ag nanoparticles sensitise IR-induced killing of cancer cells. *Cell research*, 19(8), 1031–1034. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.89>
14. Eckhardt, S., Brunetto, P. S., Gagnon, J., Priebe, M., Giese, B., Fromm, K.M. (2013) Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical Reviews*, 113, 4708–4754. <https://doi.org/10.1021/cr300288v>
15. Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(4), 301–316.
16. Rudakiya, D. M., & Pawar, K. (2017). Bactericidal potential of silver nanoparticles synthesized using cell-free extract of *Comamonas acidovorans*: in vitro and in silico approaches. *3 Biotech*, 7(2), 92. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0728-3>
17. Adeleke, B. S., Olowe, O. M., Ayilara, M. S., Fasusi, O. A., Omotayo, O. P., Fadiji, A. E., ... & Babalola, O. O. (2024). Biosynthesis of nanoparticles using microorganisms: a focus on endophytic fungi. *Heliyon*, 10(21). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39636>
18. Dhand, V., Soumya, L., Bharadwaj, S., Chakra, S., Bhatt, D., & Sreedhar, B. J. M. S. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.018>
19. Khalil, M. M., Ismail, E. H., El-Baghdady, K. Z., & Mohamed, D. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1131–1139. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.007>
20. Ameen, F., AlYahya, S., Govarthanan, M., Aljahdali, N., Al-Enazi, N., Alsamhary, K., ... & Alharbi, S. A. (2020). Soil bacteria *Cupriavidus* sp. mediates the extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 1202, 127233. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127233>
21. Parveen, K., Banse, V., & Ledwani, L. (April 2016). Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages. In *AIP conference proceedings* (Vol. 1724, No. 1). AIP Publishing. <https://doi.org/10.1063/1.4945168>
22. De Mel, S., Gruenler, J., Khoury, L., Heynes, A., Fazekas, J., Damaske, K., ... & Anderson, R. S. (2025). Green synthesis of silver nanoparticles using *Magnolia alba* leaf extracts and evaluating their antimicrobial, anticancer, antioxidant, and photocatalytic properties. *Scientific Reports*, 15(1), 23709. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-08468-3>
23. Sharaf EM, Hassan A, AL-Salmi FA, Albalwe FM, Albalawi HMR, Darwish DB and Fayad E (2022) Synergistic antibacterial activity of compact silver/ magnetite core-shell nanoparticles against Gram-negative foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13, 929491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.929491>
24. Zhang, L., Wu, L., Si, Y., and Shu, K. (2018). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalisation. *PLoS One*, 13, e0209020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209020>
25. Al-Siraj, S. S., Badr, J. M., & El-Masry, D. M. A. (2024). Antibacterial effect of bay leaf (*Laurusnabilis*) aqueous extract and its nano-emulsion on some pathogenic bacteria. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 12(9), 1670–1680. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2024/12.9.1670.1680>
26. Wang, S., Kim, M. C., Kang, O. H., & Kwon, D. Y. (2020). The mechanism by which bisdemethoxycurcumin enhances the efficacy of conventional antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7945. <https://doi.org/10.3390/ijms21217945>
27. Choi, J. S., Jung, H. C., Baek, Y. J., Kim, B. Y., Lee, M. W., Kim, H. D., & Kim, S. W. (2021). Antibacterial activity of green-synthesised silver nanoparticles using *Areca catechu* extract against antibiotic-resistant bacteria. *Nanomaterials*, 11(1), 205. <https://doi.org/10.3390/nano11010205>
28. Liu, H. Y., Prentice, E. L., & Webber, M. A. (2024). Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00046-3>
29. Ahmed, N., Abusalah, M. A. H. A., & Abuarqoub, A. H. (2025). Nanomedicine in the Fight Against Multidrug-Resistant Infections: A Review on Emerging Strategies and Translational Prospects. *International journal of nanomedicine*, 20, 12331–12362. <https://doi.org/10.2147/IJN.S547259>
30. Eker, F., Akdaşçi, E., Duman, H., Bechelany, M., & Karav, S. (2025). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts: A comprehensive review of physicochemical properties and multifunctional applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6222. <https://doi.org/10.3390/ijms26136222>
31. Hashemi, Z., Shirzadi-Ahodshti, M., Mortazavi-Derazkola, S., & Ebrahimzadeh, M. A. (2022). Sustainable biosynthesis of metallic silver nanoparticles using barberry phenolic extract: Optimisation and evaluation of photocatalytic, in vitro cytotoxicity, and antibacterial activities against multidrug-resistant bacteria. *Inorganic Chemistry Communications*, 139, 109320. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109320>
32. Mehata, M. S. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using *Kalanchoe pinnata* leaves (life plant) and their antibacterial and photocatalytic activities. *Chemical Physics Letters*, 778, 138760. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.138760>

33. Esmaili, F., Koohestani, H., & Abdollah-Pour, H. (2020). Characterisation and antibacterial activity of silver nanoparticles green-synthesised using *Ziziphora clinopodioides* extract. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 14, 100303. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100303>
34. Liu, L., Beck, C., Nøhr-Meldgaard, K., Peschel, A., Kretschmer, D., Ingmer, H., & Vestergaard, M. (2020). Inhibition of the ATP synthase sensitises *Staphylococcus aureus* to human antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 10(1), 11391. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68146-4>
35. Kim, C., Milheirico, C., Gardete, S., Holmes, M. A., Holden, M. T., de Lencastre, H., & Tomasz, A. (2012). Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 287(44), 36854–36863.
36. Pinho, M. G., S. R. Filipe, H. de Lencastre, and A. Tomasz (2001) Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 183, 6525–6531. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6525-6531.2001>
37. Alavi, M., Li, L., & Nokhodchi, A. (2023). Metal, metal oxide and polymeric nanoformulations for the inhibition of bacterial quorum sensing. *Drug Discovery Today*, 28(1), 103392. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103392>
38. Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, 4(10), 634–641. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>