

Bioinformatics study of the effects of eugenol, carvacrol, caffeic acid, ferulic acid, thymol compounds in inhibiting the glucosyltransferase enzyme produced by *Streptococcus mutans* bacteria in order to treat common dental caries

Fereshteh Samadi Athar[✉]

Abstract

Introduction: Tooth decay is one of the most common human diseases, which is caused by many factors such as microorganisms, diet, the passage of time, and the host itself. *Streptococcus mutans* is one of the microorganisms that cause tooth decay. This study aims to bioinformatically investigate the effects of eugenol, carvacrol, caffeic acid, ferulic acid, thymol compounds in inhibiting glucosyltransferase enzyme in *Streptococcus mutans* bacteria to introduce effective compounds in the treatment of dental caries

Methods: In this study, in order to investigate how the compounds, bind to the active site of the enzyme, drawing the chemical structure of the compounds, energy optimization, docking studies and final analyzes from H Dock online server and Hyperchem, Chimera, and Discovery software respectively. and the Pdb Sum Generate server was used.

Findings: The studied compounds can occupy the active site of the glucosyltransferase enzyme, and the binding energy level in eugenol was -106.21, carvacrol -100.72, caffeic acid -134.15, ferulic acid -132.46, thymol -95.22.

Conclusion: Considering the effectiveness of compounds in bioinformatics study, for additional investigations, the effect of this compound can be analyzed in vitro and in vivo.

Keywords: Glucosyltransferase enzyme, molecular docking, dental caries, *Streptococcus mutans*, effective compounds

✉. Bachelor of Microbiology, Islamic Azad University, Tabriz branch, East Azerbaijan, Iran. samadi.athar@gmail.com

بررسی بیوانفورماتیکی اثر ترکیبات اوژنول، کارواکرول، کافئیک اسید، فرولیک اسید، تیمول در مهار آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز تولید شده از باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* به منظور درمان پوسیدگی های شایع دندان

فرشته صمدی اطهر^{۴۹}

چکیده

مقدمه: پوسیدگی دندان یکی از شایع ترین بیماری های افراد است که عوامل زیادی مانند میکروارگانیسم ها، رژیم غذایی، گذشت زمان و خود میزبان در ایجاد آن نقش دارند. *استرپتوکوک موتانس* یکی از میکروارگانیسم هایی است که در ایجاد پوسیدگی دندان مطرح است. این مطالعه قصد دارد با هدف بررسی بیوانفورماتیکی اثر ترکیبات اوژنول، کارواکرول، کافئیک اسید، فرولیک اسید، تیمول در مهار آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز تولید شده از باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*، به معرفی ترکیبات مؤثر در درمان پوسیدگی های شایع دندان بپردازد.

روش ها: در این مطالعه به منظور معرفی ترکیبات مؤثر در درمان پوسیدگی های شایع دندانی، به بررسی نحوه اتصال ترکیبات به جایگاه فعال آنزیم، ترسیم ساختار شیمیایی ترکیبات، بهینه سازی انرژی، مطالعات داکینگ پرداخته شد و تجزیه و تحلیل های نهایی به ترتیب از سرور آنلاین H Dock و نرم افزارهای Hyperchem, Chimera, Discovery و سرور Pdb Sum Generate انجام شد.

۴۹. کارشناسی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، آذربایجان شرقی، ایران.
samadi.athar@gmail.com

یافته‌ها: مطالعات نشان داد که ترکیبات مورد مطالعه، قادر به اشغال جایگاه فعال آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز می‌باشند به طوری که سطح انرژی اتصال در اوژنول 106.21-، کارواکرول 100.72-، کافئیک اسید 134.15-، فرولیک اسید 132.46-، تیمول 95.22- تعیین شد. با توجه به اثربخشی ترکیبات در مطالعه بیوانفورماتیکی، برای بررسی‌های تکمیلی می‌توان اثر این ترکیب را در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد آنالیز قرار داد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز، داکینگ مولکولی، پوسیدگی دندان، استرپتوکوکوس موتانس، ترکیبات مؤثر.

مقدمه

رایج‌ترین مشکل دهان و دندان را می‌توان پوسیدگی دندان دانست. در مورد پاتوژن پوسیدگی دندان، در درجه اول روی میکروارگانیسم‌ها بویژه روی *استرپتوکوک موتانس* (*S. mutans*) تأکید می‌شود. البته شایان ذکر است که در بروز پوسیدگی دندان عوامل دیگری نیز دخالت دارند که پاسخ‌های ایمنی میزبان از جمله آنها می‌باشد [6]. باکتری‌های موجود در دهان، با متابولیسم کربوهیدرات‌ها منجر به تولید اسید، کاهش مینا و پوسیدگی دندان می‌شوند [2]. *استرپتوکوکوس موتانس*، یک باکتری اسیدوژنیک و تا حدی اسیدوریک و فاکتور اتیولوژیک اصلی در پوسیدگی دندان انسان است. این باکتری از دسته کوکسی‌های گرم مثبت و از خانواده استرپتوکوک‌های گروه ویریدانس است. از آنجایی که استرپتوکوک‌های گروه ویریدانس فلور طبیعی دهان و حلق است، استرپتوکوکوس‌های این گروه همگی در محیط دهان یافت می‌شوند اما در بین همه آنها، اثر پوسیدگی‌زایی *استرپتوکوکوس موتانس* و سپس *استرپتوکوکوس سابیرینوس* مشاهده شده است. خاصیت رشد در محیط اسیدی، مهم‌ترین ویژگی *استرپتوکوکوس موتانس* است که مرتبط با پوسیدگی‌زایی آن می‌باشد [3].

اوژنول^{۵۰} ماده‌ای فنلی است و اثر ضد میکروبی این ماده به دلیل همین ساختار فنلی

است؛ همچنین اوژنول دارای اثرات تحریکی بر روی بافت‌های دهانی، افزایش‌دهنده فشارخون، اثر درمانی در عفونت‌های روده‌ای و عفونت‌های دندان‌ها، عفونت‌های دستگاه ادراری تناسلی، پوستی و تنفسی نیز است [4]. اوژنول از اسانس گیاهانی چون میخک، دارچین، مریم‌گلی، جوز هندی، ریحان و برگ فلفل به میزان‌های مختلف نیز به‌دست می‌آید [5]. این اسانس در تهیه محلول‌های شست‌وشوی دهان، همچنین در پزشکی و دندانپزشکی به عنوان ضد عفونی‌کننده و مسکن کاربرد دارد [1].

کارواکرول^۱ یک عصاره گیاهی خوراکی است که در آب نامحلول بوده اما در الکل و اتر حل می‌شود؛ دارای طیف وسیعی از اثرات ضد میکروبی است. این ماده باعث مهار فعالیت ATPase و افزایش نفوذپذیری غیراختصاصی غشای سلول باکتری می‌شود و نه تنها خود باعث مهار جمعیت میکروبی می‌شود بلکه با افزایش نفوذپذیری غشاء باکتری‌ها، آنها را نسبت به سایر مواد ضد باکتری حساس و آسیب‌پذیر می‌کند [7,8].

کافئیک اسید^۲ یک ترکیب آلی است که به‌طور طبیعی توسط بسیاری از گیاهان از جمله دانه‌های قهوه تولید می‌شود. این ماده دارای هر دو گروه عملکردی آکرلیک و فنلیک می‌باشد. استرهای فنیل کافئیک اسید، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی هیالورونیدازی را نشان می‌دهند. کافئیک اسید فعالیت ضد باکتری، ضد جهش‌زایی و ضد ویروسی دارد [9].

فرولیک اسید^۳ یک ترکیب لیگنوسلولزی، روشن‌کننده پوست، مکمل گیاهی و ترکیب ترکیب آلی است که با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهد. این ترکیب سرشار از ترکیبات فنولیک دیواره سلول گیاهی مانند آرابینوکسی لانز^۴ است. فرولیک اسید در برگ‌ها و دانه‌های گزنه، عصاره دارچین، گندم، برنج، جوی صحرایی، تمشک، ذرت و توت‌فرنگی وجود دارد. فرولیک اسید دارای خواص باکتری‌سیدال و باکتریواستاتیک است. فرولیک

۱. Carvacrol

۲. Caffeic acid

۳. Ferulic acid

۴. Arabinoxylans

اسید یک هیدروکسی سینامیک اسید بوده و از اسید کافئیک مشتق می‌شود [10]. تیمول^۱ از ترکیبات فنولی مونوترپنوئید اصلی در اسانس روغنی گرفته شده از گیاهان خانواده نعنائیان مانند آویشن، ریحان و مرزنجوش و گیاهان دیگر متعلق به خانواده شاه‌پسندیان، گل میمونیان، آلاله‌ها و چتریان است [11]. تیمول، فعالیت‌ها و عملکردهای مختلفی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، بی‌حسی موضعی، ترمیم زخم، آنتی‌سپتیک بودن و خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی دارد [12].

آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در مکانیسم اولیه اتصال / استرپتوکوکوس موتانس با ایجاد هوموپلیمرهای گلوکان از سوکروز دخیل است [13] و نشان داده شده است که اصلی‌ترین عامل بیماری‌زایی برای این‌گونه استرپتوکوکی در پوسیدگی دندان می‌باشد [14]. گلوکوزیل ترانسفراز، دو واکنش اصلی را کاتالیز می‌کند که شامل شکستن سوکروز به گلوکز و فروکتوز (فعالیت سوکرازی) و انتقال واحدهای گلوکز در موقعیت C-6 / C-3 برای تولید گلوکان (فعالیت ترانسفرازی) است [15]. هدف از این مطالعه بررسی بیوانفورماتیکی تأثیر مهارت ترکیبات اوژنول، کارواکرول، کافئیک اسید، فرولیک اسید، تیمول بر روی آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز تولید شده از باکتری / استرپتوکوکوس موتانس به منظور درمان پوسیدگی‌های شایع دندانی بود.

روش‌ها

در این تحقیق از پایگاه داده H Dock برای انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. داکینگ مولکولی یک روش محاسباتی است که در این روش، سه‌بعدی‌سازی ساختار مولکولی و اتصالات آن با دیگر مولکول‌ها بررسی می‌شود. هدف از داکینگ مولکولی پیش‌بینی ساختارهای پیوندی با اتصالات قوی بین دو مولکول می‌باشد. بدین‌منظور فایل لیگاند و پروتئین در سایت آپلود و نتیجه داکینگ مشاهده شد. در این پژوهش، ترکیباتی با خاصیت دارویی مورد بررسی قرار گرفتند. ساختار ترکیبات موردنظر از سایت

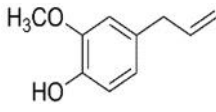
۱. Thymol

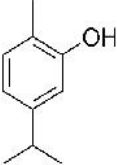
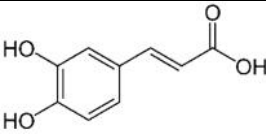
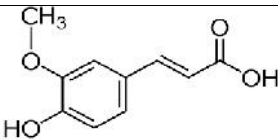
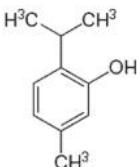
مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. ساختار کریستالی مناسب آنزیم حاوی بخش کاتالیتیکی مرکزی از سایت <https://www.rcsb.org/pdb> انتخاب و دانلود شد. کد آنزیم در این سایت 3aib با وضوح ۶/۱ آنگستروم است.

آماده کردن لیگاند و پروتئین گلوکان سوکراز برای داکینگ: ساختار دوبعدی لیگاندهای مورد نظر توسط برنامه Hyperchem ترسیم شد و سپس توسط همین نرم افزار از نظر انرژی، بهینه سازی گردید. در مرحله بعد ساختارهای اضافی آنزیم شامل بخش آبی و بخش های غیر پروتئینی با استفاده از نرم افزار Discovery حذف شد و پس از آن، توسط برنامه Chimera کاملاً بهینه سازی شده و آماده داکینگ مولکولی شد. فایل پروتئین و فایل لیگاند مورد مطالعه در سرور H Dock بارگذاری و ثبت شد. در مرحله بعد، ۱۰ مدل برتر داکینگ مولکولی دانلود و مدلی که انرژی اتصال منفی تر داشت، انتخاب و کاملاً بررسی شد.

مشاهده و آنالیز نتایج داکینگ: پس از انجام عملیات داکینگ، نتایج به دست آمده شامل Most favoured regions و Disallowed regions، انرژی اتصال لیگاندها، انواع برهم کنش های لیگاند با پروتئین شامل برهم کنش های هیدروژنی، برهم کنش های هیدروفوبی، انواع برهم کنش های عدد پی، برهم کنش با یون های مس موجود در جایگاه فعال آنزیم می باشد و سایر موارد قابل مشاهده و تجزیه و تحلیل هستند. به منظور دستیابی به اطلاعات مذکور از نرم افزار Discovery Studio 2021 Client و دو پایگاه داده، HDOCK Pdb Sum Generate استفاده شد.

جدول ۱. نام و جزئیات ساختاری ترکیبات مورد مطالعه

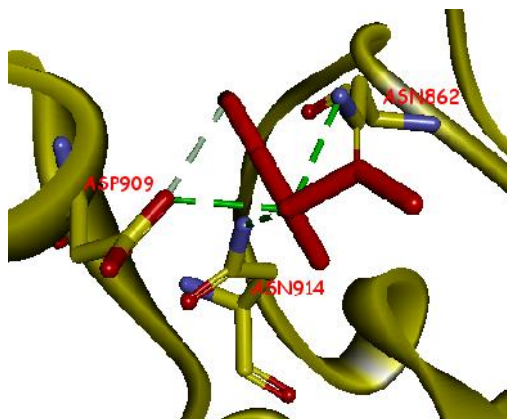
 <p>The image shows the chemical structure of 4-Allyl-2-methoxyphenol. It consists of a benzene ring with a methoxy group (H₃CO) at the 2-position, a hydroxyl group (HO) at the 1-position, and an allyl group (-CH₂-CH=CH₂) at the 4-position.</p>	<p>اوژنول 4-Allyl-2-methoxyphenol</p>
--	---

	کارواکربول 5-isopropyl-2-methylphenol
	کافئیک اسید 3-(3,4-Dihydroxyphenyl) 2-propenoic acid
	فرولیک اسید Ferulic acid
	تیمول 2-Isopropyl-5-methylphenol

یافته‌ها

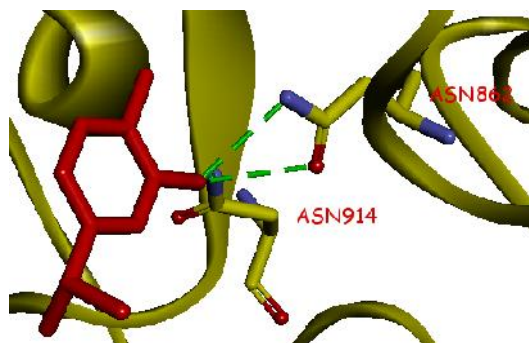
در مطالعات داکینگ این مسئله مطرح است که چگونه دو یا چند مولکول در اتصال با هم متناسب هستند. تعیین مشخصات و رفتار اتصال دهنده نقش مهمی در طراحی منطقی داروها و همچنین روشن ساختن فرایندهای بیوشیمیایی اساسی دارد. به همین منظور برای جست‌وجوی یک لیگاند مناسب که هم از نظر انرژی و هم از نظر هندسی با محل اتصال پروتئین مطابقت دارد به این شیوه عمل می‌کنیم:

در تصاویر زیر نتایج بررسی نرم‌افزار Discovery studio پس از عملیات داکینگ نشان داده شده است.



شکل ۱. ترکیب اوژنول در جایگاه فعال آنزیم

شکل ۱ اوژنول را نشان می‌دهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای ASN862, ASP909, ASN914 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می‌کند و سطح انرژی اتصال 106.21- است.



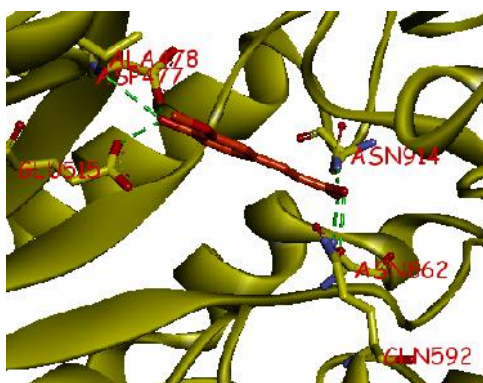
شکل ۲. ترکیب کارواکرول در جایگاه فعال آنزیم

شکل ۲ کارواکرول را نشان می‌دهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای ASN914, ASN862 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می‌کند و سطح انرژی اتصال 100.72- است.



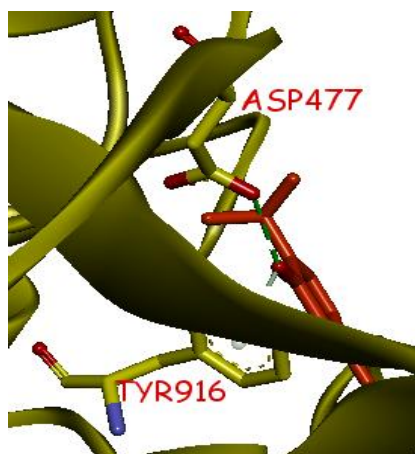
شکل ۳. ترکیب کافئیک اسید در جایگاه فعال آنزیم

شکل ۳ کافئیک اسید را نشان می‌دهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای ALA478, ASN862, ASN914, GLN592, ASP477, در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می‌کند و سطح انرژی اتصال -134.15 است.



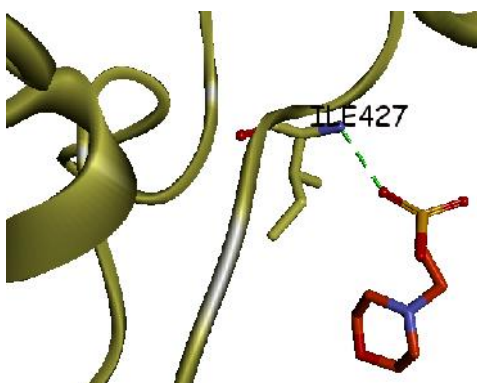
شکل ۴. ترکیب فرولیک اسید در جایگاه فعال آنزیم

شکل ۴ فرولیک اسید را نشان می‌دهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای ALA478, ASN862, ASN914, GLN592, ASP477, در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می‌کند و سطح انرژی اتصال -132.46 است.



شکل ۵. ترکیب تیمول در جایگاه فعال آنزیم

شکل ۵ تیمول را نشان می‌دهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسیدهای ASP477, TYR916 در تشکیل پیوند هیدروژنی شرکت می‌کند و سطح انرژی اتصال 95.22- است.



شکل ۶. ترکیب کوکریستال در جایگاه فعال آنزیم

شکل ۶ کوکریستال را در جایگاه فعال آنزیم نشان می‌دهد که با داکینگ در جایگاه فعال آنزیم قرار گرفته و با آمینو اسید ILE427 پیوند هیدروژنی برقرار کرده است.

بحث

پوسیدگی دندان، شایع‌ترین بیماری مزمن و عفونی ناشی از کلونیزاسیون باکتری‌ها

است که با دکلسیفیکاسیون^۱ بخش غیرآلی دندان شروع شده و با تخریب ماتریکس آلی دنبال می‌شود. این بیماری، عفونی و قابل انتقال بوده و از فاکتورهای اصلی مؤثر در آن، استرپتوکوک موتانس است. فاکتورهای کاربوژنیک/استرپتوکوک موتانس شامل چسبندگی به سطوح دندان، تولید اسید و توانایی ادامه زندگی در محیط اسیدی است. این باکتری‌ها، با تخمیر کربوهیدرات‌های موجود در رژیم غذایی به‌وسیله آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز، یک گلوکان چسبنده تولید می‌کنند که در نهایت منجر به تجمع بیوفیلم یا پلاک و تسهیل در چسبندگی آنها به سطوح دندان می‌شود. در پلاک دندان که یک توده ژلاتینی از میکروارگانیسم‌های چسبیده به ساختمان دندان است، توسط باکتری‌ها اسید تولید می‌شود که می‌تواند مواد معدنی دندان را از بین ببرد. بر اساس مطالعات انجام گرفته آلودگی بزاق با/استرپتوکوک موتانس با یافته‌های بالینی پوسیدگی در ارتباط است و سرکوب آن به‌طور مشخصی سبب کاهش ریسک پیشرفت این بیماری می‌شود. با مهار این آنزیم تولیدشده از باکتری، از تشکیل پلی‌ساکاریدهای سطحی جلوگیری به عمل آمده و از تجمع کربوهیدرات‌ها با حذف متابولیسم میکروبیال نیز جلوگیری می‌شود.

داکینگ مولکولی به دلیل توانایی آن در پیش‌بینی اتصال و ترکیب لیگاند‌های مولکولی کوچک به محل اتصال مناسب، یکی از متداول‌ترین روش‌ها در طراحی دارو است. تعیین مشخصات و رفتار اتصال‌دهنده، نقش مهمی در طراحی منطقی داروها و همچنین روشن ساختن فرایندهای بیوشیمیایی اساسی دارد. این روش برای جست‌وجوی یک لیگاند مناسب است که هم از نظر انرژی و هم از نظر هندسی با محل اتصال پروتئین مطابقت دارد. به‌عبارت دیگر، در مطالعات داکینگ این مسئله مطرح است که چگونه دو یا چند مولکول در اتصال با هم متناسب هستند و مشابه حل کردن یک پازل سه‌بعدی است.

نتایج حاصل از داکینگ نشان می‌دهد که ترکیبات اوژنول، کارواکرول، کافئیک اسید، فرولیک اسید، تیمول می‌توانند به جایگاه فعال آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز متصل و

۱. decalcification

موجب مهار این آنزیم شوند. اوژنول دارای ۳ پیوند هیدروژنی با آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در جایگاه فعال آنزیم است. کارواکرول دارای ۲ پیوند هیدروژنی با آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز است. تیمول دارای ۲ پیوند هیدروژنی با آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز است.

کافئیک اسید دارای ۶ پیوند هیدروژنی با آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در جایگاه فعال آنزیم است و ترکیب خوبی می‌باشد.

فرولیک اسید دارای ۶ پیوند هیدروژنی با آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز در جایگاه فعال آنزیم است و ترکیب خوبی می‌باشد.

در مطالعه‌ای که امکا و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در درمان پوسیدگی و تشکیل پلاک دندان انجام دادند ترکیب منگیفرین با آمینو اسید, ASN862, ASP593, ASP588, GLN592, ASP909, HIS567, ARG475 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است. درحالی که از بین ترکیبات مورد مطالعه حاضر، اوژنول و کارواکرول و کافئیک اسید و فرولیک اسید با آمینو اسید ASN862 و کافئیک اسید و فرولیک اسید با GLN592 و اوژنول با ASP909 برهم کنش داشت [16].

در مطالعه‌ای دیگر داسیلوا و همکاران در سال ۲۰۲۱ که علیه عوامل بیماری‌زایی استرپتوکوکوس موتانس تحقیقاتی انجام دادند. ترکیب Erystagallin با آمینو اسیدهای ASP760, GLU701, GLU706, PHE656, TRP816 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است درحالی که هیچ‌کدام از ترکیباتی که در مطالعه حاضر بررسی شدند با این آمینو اسیدها برهم کنش نداشته است.

از ترکیبات دیگر آنها Malvidin-3,5-digluconide است که با آمینو اسیدهای ARG540, ASN573, TRP517, ASN481, TYR430, ASP480, GLU515, ASP588, LEU433, PLE907, GLN592, SER589, ASP593 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده بود در بین ترکیباتی که در مطالعه حاضر بررسی شدند، کافئیک اسید و فرولیک اسید با GLN592, GLU515 برهم کنش داشتند [17].

در مطالعه دیگری که توسط سوهی ایتو و همکارانش در سال ۲۰۱۱ به جهت بررسی

پوسیدگی دندان بوسیله پاتوژن/استرپتوکوکوس موتانس صورت گرفت ترکیب Acarbose با آمینو اسیدهای TRP517, ASP588, TYR916 پیوند هیدروژنی در جایگاه فعال آنزیم برقرار کرده است. از میان ترکیبات بررسی شده در مطالعه حاضر، فقط تیمول با آمینو اسید TYR916 برهم‌کنش داشته است. از دیگر ترکیباتشان مالتوز می‌باشد که با آمینو اسیدهای TRP517, ASP588, CYS3 در جایگاه فعال آنزیم پیوند هیدروژنی برقرار کرده است که هیچ‌کدام از ترکیب مورد مطالعه با این اسید آمینه‌ها برهم‌کنش ندارند [18].

نتیجه گیری نهایی

این مطالعات نشان داد که ترکیبات مورد مطالعه، قادر به اشغال جایگاه فعال آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز است به طوری که سطح انرژی اتصال در اوژنول 106.21-، کارواکرول 100.72-، کافئیک اسید 134.15-، فرولیک اسید 132.46-، تیمول 95.22- تعیین شد. نتایج حاصل از داکینگ نشان می دهد که ترکیبات اوژنول، کارواکرول، کافئیک اسید، فرولیک اسید، تیمول می توانند به جایگاه فعال آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز متصل و موجب مهار آنزیم گلوکوزیل ترانسفراز و در نتیجه کاهش احتمال پوسیدگی دندانی شوند. همچنین در میان ترکیبات مورد مطالعه، کافئیک اسید و فرولیک اسید اثرات مهاری خوبی بر روی این آنزیم داشتند.

مراجع

1. میرحیدری ح. معارف گیاهی. تهران: فرهنگ اسلامی، ۱۳۷۲.
2. Coogan MM, Mackeown JM, Galpin JS, Fatti LP. **Microbiological impressions of teeth, saliva and dietary fibre can predict caries activity.** *J Dent.* 2008; 36(11): 892-9.
3. Olak J, Mandar R, Karjalainen S, Soderling E, Saag M. **Dental health and oral mutans streptococci in 2-4- year-old Estonian children.** *Int J Paediatr Dent.* 2007 ;17(2): 92-7.
4. Dominique B. **Antimicrobiol properties of essential oils.** *Positive Health, Complementary Medicine Magazine* 1988: 1-10.
5. Paul ST, Minnesota M. **Antimicrobial effect of spices and herbs.** *Hospitality Institute of Technology and Management*; 1997.
6. Lehner T: **Immunology of oral diseases.** 3rd Ed. USA: *Blackwell Scientific Pub.*, 1992; Chap6:68-101.
7. Gill Ao, Holley RA. **Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakci cellular membrane by plant oil aromatics.** *Int J Food Microbiol* 2006; 108(1): 1-9.
8. Helander I, Alokomi H, Latvakal K, Sandholm M. **Characterization of the action of essential oil components on Gram negative bacteria.** *J Agriculture and Food Chemistry* 1998; 46: 3590-95.
9. Kishimoto, N., Kakino, Y., Iwai, K., Mochida, K. & fujita, T. (2005). **In vitro antibacterial, antimutagenic and anti – influenza virus activity of caffeic acid and phenethyl ester.** *Biocontrol Sci* 10:155-161.
10. Stapleton, P.D., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M.T., Hara, Y., Nagaoka, Y., and

- Kumagai, A., et al., 2004b. **Anti-Staphylococcus aureus activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, PP: 374-380.
11. Mancini E, Senatore F, Del Monte D, De Martino L, Grulova D, Scognamiglio M, et al. **Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five Thymus vulgaris L. essential oils.** *Molecules*. 2015; 20(7):12016-28.
 12. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. **Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems.** *Pharmacology*. 2006; 76(2):61-8.
 13. Kuramitsu HK. **Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics.** *Critical Review of Oral Biological Medicine* 1993; 4: 159-176.
 14. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. **Role of the Streptococcus mutans gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model.** *Infection and Immunity* J 1993; 61: 3811-3817.
 15. Eto A, Saido TC, Fukushima K, Tomioka S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. **Inhibitory effect of a self-derived peptide on Glucosyltransferase of Streptococcus mutans.** *J of Biological Chemistry* 1999; 274(22): 15797-15802.
 16. Inhibitory Potential of Mangiferin on Glucansucrase Producing Streptococcus mutans Biofilm in Dental Plaque: Promise Emeka, Lorina Badger-Emeka, Villianur Hairul-Islam, Krishnaraj Thriugnanasambantham; 2020.
 17. Molecular Docking of Phytochemicals against Streptococcus mutans Virulence Targets: A Proteomic Insight into Drug Planning: Diego Romário da Silva, Tahyná Duda Dops, Otavio Akira Souza Sakaguchi, Edja Maria Melo de Brito Costa, Carlus Alberto Oliveira dos Santos, Joanilda Paolla Raimundo e Silva, Bruna Dantas da Silva, Frederico Favaro Ribeiro, Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Júnior and Andréa Cristina Barbosa da Silva; 2021.
 18. Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen Streptococcus mutans: Keisuke Ito, Sohei Ito, Tatsuro Shimamura, Simone Weyand; 2011.