

DÉBORA SOUZA BILÉCO

**EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS
DESINFETANTES NA REMOÇÃO DE BIOFILME EM
RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

DÉBORA SOUZA BILÉCO

**EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS
DESINFETANTES NA REMOÇÃO DE BIOFILME EM
RESINA ACRÍLICA ESPECÍFICA PARA PRÓTESE OCULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Profa. Ass. Dr. Daniela Micheline dos Santos

Araçatuba – SP
2015

Aos meus pais, Adão e Vanda, por proporcionarem que meus sonhos se realizassem e por todo apoio e esforço para que mais essa conquista fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por conceder-me o dom da vida e servir de apoio em momentos de dificuldade.

Agradeço a minha família por mesmo de longe sempre se fazer presente, em especial aos meus pais, Adão e Vanda, por me apoiarem e incentivarem a conquistar meus objetivos.

A minha orientadora, Prof. Ass. Dr. Daniela Micheline dos Santos, por tornar esse trabalho possível, por sua atenção, disponibilidade e ensinamentos repassados.

A doutoranda Agda Marobo Andreotti, por estar presente na realização dessa pesquisa, pela sua paciência, companheirismo e compartilhamento de informações que tornaram esse trabalho prazeroso e enriquecedor.

A Prof. Ass. Dr. Cristiane Duque por sua colaboração na realização da pesquisa auxílio na condução dos experimentos.

Aos meus amigos: Aline, Amanda, Bianca, Caio, Dinah, Gabriela, Marina, Nayara, Paola, Rafael, Ruan, Tahiana, Victória e Waddington, por muitas vezes serem minha família em Araçatuba e fazerem desses cinco anos uma eterna boa lembrança.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

BILÉCO, D.S. **Efeito de diferentes tratamentos desinfetantes na remoção de biofilme em resina acrílica para prótese ocular.** 2015. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos desinfetantes na remoção de biofilme de *Staphylococcus aureus* da superfície de resinas acrílicas específicas para prótese ocular. Foram confeccionados corpos de prova de resina acrílica branca (cor N1) utilizada na confecção de escleras artificiais de próteses oculares, os quais foram divididos em 6 grupos de 6 corpos de prova, para cada tipo de desinfetante. O desenvolvimento do biofilme foi avaliado após desinfecção com as seguintes soluções: sabão neutro, clorexidina 4%, Efferdent, triclosan 1% e citronela, e um grupo não desinfetado, o qual ficou imerso em soro fisiológico (grupo Controle). Após procedimentos de desinfecção, o biofilme restante foi avaliado pela contagem das Unidades Formadoras de Colônias. Os dados foram submetidos à análise estatística. Observou-se que o fator desinfetante apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). Além disso, os valores de UFCs das amostras tratadas com Clorexidina 4% e Triclosan 1%, foram menores estatisticamente em relação aos demais tratamentos ($p < 0,001$). As amostras tratadas com Sabão Neutro apresentaram menor número de UFCs, estatisticamente significantes ($p = 0,008$), quando comparadas com as amostras dos grupos Sem Desinfecção. Pode-se observar também a diferença estatística significativa ao se comparar o grupo Controle com as amostras tratadas com Citronela ($p = 0,035$) ou Efferdent ($p = 0,041$). Conclui-se que Clorexidina 4% e o Triclosan 1% foram os desinfetantes mais efetivos na remoção do biofilme nas superfícies da resina acrílica.

Palavras-Chave: Resina Acrílica. Olho Artificial. Microrganismos. Desinfecção.

BILÉCO, D.S. **Effect of different disinfectants treatments in removing biofilm of acrylic resins specific for ocular prosthesis.** 2015. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different disinfectant treatments on *Staphylococcus aureus* biofilm removal from the surface of acrylic resins specific for ocular prosthesis. Acrylic resin specimens used in the manufacture of artificial sclera for ocular prostheses were made (color N1) and divided into six groups of six specimens for each type of disinfectant. The development of the biofilm was evaluated after disinfection with the following solutions: neutral soap, 4% Chlorhexidine, Efferdent, 1% Triclosan and Citronella, and one group was not disinfected, being immersed in saline (Control group). After disinfection procedures, the remaining biofilm was evaluated by counting the Colony Forming Units. Data were statistically analyzed. It was observed that the disinfectant factor showed statistically significant difference ($p < 0.0001$). In addition, the CFU values of samples treated with 4% Chlorhexidine and 1% Triclosan were statistically lower compared to the other treatments ($p < 0.001$). Samples treated with neutral soap presented lowest CFU values, statistically significant ($p = 0.008$) when compared to No Disinfection and control groups. A statistically significant difference was also observed when comparing the control group with the samples treated with Citronella ($p = 0.035$) or Efferdent ($p = 0.041$), but these were not different compared to the No Disinfection group. It can be concluded that the disinfectants which removed the biofilm more accurately were 4% Chlorhexidine and 1% Triclosan.

Keywords: Acrylic Resins. Artificial Eye. Microorganisms. Disinfection

LISTA DE ABREVIATURAS

DO= Densidade óptica

UFC= Unidades formadoras de colônias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedimentos de desinfecção realizados nos corpos de prova de resina acrílica 16

Tabela 2 - Número de células aderidas de *Staphylococcus aureus* por ml para cada tratamento desinfetante proposto. 18

SUMÁRIO

1 Introdução	10
2 Objetivo	12
3 Materiais e métodos	13
4 Resultado	18
5 Discussão	19
6 Conclusão	21
Referências	22

1 INTRODUÇÃO

A prótese ocular é considerada um importante tratamento para pacientes que foram submetidos à perda total ou parcial do globo ocular devido a trauma, neoplasias ou deformações congênitas¹, refletindo na reintegração do indivíduo à sociedade, contribuindo com seu desenvolvimento psíquico social, além de proporcionar melhoria em sua qualidade de vida²⁻³. Entretanto, os usuários de prótese ocular são susceptíveis a infecções, inflamações e traumas relacionados a modificações fisiológicas e morfológicas da cavidade anoftálmica; colonização da cavidade por microbiota patogênica; mobilidade prejudicada devido a instalação inadequada da prótese; higienização da prótese negligenciada sem remover a prótese da cavidade por meses ou anos e sem lavá-la; e acúmulo de secreção, que pode causar conjuntivite papilar e intolerância ao uso da prótese.⁴

O controle de formação de biofilme é muito importante para manter a saúde da cavidade anoftálmica dos portadores de prótese ocular e pode ser realizado por meio de técnicas de limpeza e desinfecção diárias, entre elas o uso de sabão neutro⁵⁻⁷, encontrado facilmente no mercado.

O uso de clorexidina também tem sido recomendado como desinfetante devido à sua ação antisséptica, antifúngica e bacteriostática, impedindo a proliferação de microrganismos.⁴⁻⁶ Soluções para lentes de contato⁴⁻⁶ e até mesmo pastilhas efervescentes, como as utilizadas para desinfecção de prótese total^{5,6,8}, também têm sido relatadas, demonstrando resultados satisfatórios.

Alguns sabonetes antissépticos também podem ser usados na limpeza/desinfecção das próteses oculares, uma vez que a maioria deles apresenta em sua composição o triclosan, um importante agente antimicrobiano.⁹

A fitoterapia também é uma alternativa a ser pesquisada, sendo de baixo custo e fácil utilização, como por exemplo, a citronela.¹⁰ As espécies de *Cymbopogon*, nas quais se inclui a citronela, são comumente usadas na medicina para tratamento de muitas doenças. Os óleos essenciais dessas espécies são conhecidos pela sua atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, analgésica, antinociceptiva, neurológicas e inseticidas.¹¹⁻¹⁵

Devido à escassez na literatura de estudos mais aprofundados sobre os possíveis tratamentos desinfetantes para eliminar os microrganismos da superfície da prótese ocular, este estudo busca encontrar uma maneira satisfatória de se realizar a desinfecção dessas próteses, minimizando as infecções ocorridas.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito de diferentes soluções desinfetantes na remoção do biofilme em resina específica para prótese ocular. A hipótese nula testada é que os diferentes tratamentos de desinfecção testados não serão eficazes na remoção do biofilme da resina acrílica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

- ***Confeção dos corpos de prova em resina acrílica***

Inicialmente, foram confeccionados corpos de prova de resina acrílica N1, específica para confecção da esclera artificial (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil). Para a padronização dos corpos de prova, foi utilizada uma matriz metálica vazada na espessura de 3 mm, contendo em seu interior 10 compartimentos circulares, com dimensões de 10 mm de diâmetro cada.¹⁶ Esta matriz foi posicionada sobre uma lâmina de vidro retangular (80 mm x 35 mm x 3 mm) e seu interior foi preenchido com cera utilidade (Wilson, Polidental Ind. E Com. Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil). Em seguida o conjunto lâmina de vidro + matriz metálica foi incluído em mufla própria para polimerização em forno micro-ondas (VIPI STG, VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltd, Pirassununga, São Paulo, Brazil). Para isso, a superfície interna da base da mufla foi isolada com vaselina em pasta, sendo preenchida em seguida com gesso especial tipo IV (Durone; Dentsply Ind e Com Ltd, Rio de Janeiro, Brasil), seguindo a proporção de 100 g de pó para 30 ml de água, espatulado por 1 minuto e vertido sob vibração constante. Após a cristalização do gesso, outra lâmina de vidro com as mesmas dimensões já citadas foi posicionada sobre a matriz já incluída em gesso e fixada com cera utilidade. A contra-mufla foi posicionada e, sobre a superfície desta última lâmina de vidro, foi vertido gesso especial tipo IV. Em seguida, a mufla foi levada à prensa hidráulica de bancada (VH, Midas Dental Produtos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil) sob pressão constante de 1,2ton/F por 2 minutos. Após a cristalização do gesso, a mufla foi aberta e a cera removida do interior de cada superfície interna da matriz. A superfície do vidro foi limpa com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil). A resina acrílica termopolimerizável N1 para esclera artificial foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante. Para cada corpo de prova, 2,1 g de polímero (pó) foram misturados com 0,7 ml de monômero (líquido) para ser manipulado e, ao atingir a fase plástica, inserido no interior das superfícies internas da matriz incluída em mufla. Após a inserção, a contra-mufla foi posicionada e levada à prensa hidráulica, com força de 1,2ton/F, durante 2 minutos, e foi realizada a polimerização de bancada por 30 minutos. A resina foi polimerizada por energia de micro-ondas (Brastemp, São Paulo, Brazil) com 1200 w de potência durante 10 minutos

(6). Após a polimerização da resina, a mufla foi aberta e os corpos de prova de resina acrílica foram removidos. As superfícies dos corpos de prova foram submetidas ao polimento em uma politriz universal semiautomática (Arotec S.A. Ind Com, Cotia, São Paulo, Brasil), utilizando-se lixas metalográficas com diferentes granulações (400, 600, 800 e 1200) (Buehler, Illinois, EUA), sendo posteriormente finalizadas com solução diamantada em disco de feltro. Em seguida os corpos de prova foram submetidos à limpeza em ultrassom (Arotec, Odontobrás, São Paulo, SP) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina, e após isso foram deixados ao ar livre para secagem. Até o momento dos experimentos, as amostras foram mantidas imersas em água destilada, em uma estufa bacteriológica, a 37° C.

Em seguida, os corpos de prova foram esterilizados com óxido de etileno para garantir que não estejam contaminados no momento dos experimentos.

- ***Inoculação e condições de crescimento dos microrganismos***

A cepa utilizada para realização do ensaio foi o *Staphylococcus aureus* (ATCC29213). A cepa foi doada pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. As células foram mantidas em -70°C em solução contendo 25% de glicerol e semeadas em placas contendo meio de cultura Manitol Salt Agar (Difco, Kansas City, MO, USA), sendo incubadas a 37°C em aerobiose por 24 h.

Inicialmente, curvas de crescimento foram realizadas com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para que o microrganismo atingisse sua fase de maior multiplicação celular (fase log ou exponencial). Foram determinados os valores de Densidade Óptica (DO) e diluições necessárias. As culturas foram repicadas em meio caldo BHI (Difco) por 24h a 37°C em estufa de aerobiose. Quando a cultura atingiu a metade da fase logarítmica, as células foram ajustadas sendo diluídas em 10x em BHI caldo para obtenção de 10^7 células/ml.

- ***Desenvolvimento do biofilme***

Após o crescimento e obtenção de 10^7 células/ml, alíquotas de 1ml do microrganismo foram colocadas em contato com os corpos de prova de resina acrílica posicionados dentro de placas de microtitulação de 24 poços.

Como controle do estudo, em cada placa de 24 poços foi incluído 1 poço com meio de cultura puro sem microrganismo (para avaliar se houve contaminação do meio), 1 poço com corpos de prova sem desinfecção e sem microrganismo - controle negativo (para avaliar contaminação dos corpos de prova), e 1 poço com corpos de prova sem desinfecção e com microrganismo - controle positivo (para avaliar o crescimento sem interferência do desinfetante) e 1 poço com microrganismo e meio de cultura, sem a presença do corpo de prova.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C, em estufa de aerobiose.

- ***Desinfecção dos corpos de prova***

Após a formação do biofilme cada grupo foi submetido a cada um dos processos de desinfecção propostos a seguir (5 desinfetantes e o grupo sem desinfecção, mantido apenas em solução salina) (Tabela 1). Para isso, foram confeccionados 6 corpos de prova para cada grupo, para cada experimento, totalizando 36 amostras.

Tabela 1 - Procedimentos de desinfecção realizados nos corpos de prova de resina acrílica

Desinfetante	Desinfecção	Fabricante
Sem desinfecção (Soro fisiológico)	Imersão em 1 ml por 10 min.	Farmácia de Manipulação Apothicario Araçatuba, SP.
Sabão Neutro	Fricção digital por 30 segundos (5, 7, 18)	Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.
Clorexidina 4%	Imersão em 1 ml por 10 min (5, 6, 8, 19).	Farmácia de Manipulação Apothicario Araçatuba, SP.
Efferdent Original Denture Cleanser	Imersão em água destilada estéril contendo uma pastilha efervescente, à temperatura de 37° C por 15 min. (6, 8)	Pfizer Consumer Health, Morris Plains, Nova Jersey, EUA.
Triclosan 1%	Imersão em 1 ml por 10 min.	Farmácia de Manipulação Apothicario Araçatuba, SP
Óleo Essencial de Citronela	Imersão em 1 ml por 10 min.	Farmácia de Manipulação Apothicario, Araçatuba, SP.

Fonte:Autor

- **Contagem dos Microrganismos**

Após desinfecção, as células não aderidas foram removidas dos corpos de prova por meio de lavagem em 1ml de solução salina, duas vezes. Em seguida, cada corpo de prova foi inserido em tubos de ensaio contendo 1ml de solução salina. Os tubos foram levados para banho de limpeza por ultrassom (USC 700; UNIQUE Ultrasonic Cleaner, São Paulo, SP) a 50 kHz, 150 W, durante 20min, e ao agitador de tubos (Vórtex Biomixer QL – 901, Curitiba, PR, Brasil), por 1min para promover o desprendimento das células aderidas. Foram, então, realizadas 7 diluições seriadas, transferindo-se 50 ul dessa solução para 450 ul de solução salina. As diluições 0, 2, 4 e 7 foram plaqueadas em placa de Petri, contendo meio adequado para o microrganismo avaliado e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa de aerobiose. Após o período de incubação, foi feita a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml). Os ensaios foram realizados em duplicata, em dois dias independentes.

- **Análise Estatística**

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade, no qual se constatou distribuição normal dos dados. A ANOVA foi realizada para verificar diferença significativa no fator tratamento desinfetante. As diferenças significantes nos valores obtidos na ANOVA foram comparadas por teste de Tukey-Kramer HSD em nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS

Pode-se observar que o fator desinfetante apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). Os tratamentos realizados com Clorexidina 4% e Triclosan 1%, foram os desinfetantes mais eficazes, pois reduziram a zero o número de UFC/ml, sendo estatisticamente diferente em relação aos demais tratamentos ($p < 0,001$; Tabela 2). As amostras tratadas com Sabão Neutro apresentaram menor número de UFCs, valor estatisticamente significativo ($p = 0,008$; Tabela 2), quando comparado com os do grupo Controle. Pode-se observar também diferença estatística significativa ao se comparar os valores de UFC/ml do grupo Controle com os grupos tratados com Citronela ($p = 0,035$; Tabela 1) ou Efferdent ($p = 0,041$; Tabela 2).

Tabela 2 - Número de células aderidas de *Staphylococcus aureus* por ml para cada tratamento desinfetante proposto.

	Média	D P*
Sabão Neutro	4,08 ^b	0
Clorexidina 4%	0 ^a	1,71
Efferdent	8,08 ^c	0
Triclosan 1%	0 ^a	0
Citronela	7,53 ^c	0,31
Controle	11,08 ^d	0

Fonte: Autor

* Em escala logarítmica

Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos de agentes antimicrobianos, de acordo com os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p \leq 0.0001$

5 DISCUSSÃO

A hipótese nula do estudo foi rejeitada, visto que diferentes tratamentos de desinfecção testados foram eficazes na remoção do biofilme da superfície da resina acrílica. A desinfecção das amostras com Clorexidina 4% ou com Triclosan 1% foi eficaz, acarretando valores de UFCs, estatisticamente diferentes dos demais grupos ($p < 0,001$). A clorexidina é um composto sintético derivado a partir de uma bis-biguanida com um elevado nível de atividade antimicrobiana.¹⁷ Devido a este nível de atividade, pequenas concentrações de sais de clorexidina, são geralmente suficientes para inibir o processo reprodutivo ou exterminar espécies bacterianas. É conhecido que a ação do gluconato de clorexidina é de rápida absorção pelas células bacterianas, o que resulta em uma série de modificações na permeabilidade citológica e propriedades ópticas destes patógenos. Estudos anteriores verificaram que a clorexidina reagiu com grupos lipofílicos de células de microrganismos e provocou desorientação da lipoproteína de membrana dificultando o funcionamento da barreira osmótica.^{18,19}

Embora resultados satisfatórios fossem encontrados para o tratamento Clorexidina 4% na redução bacteriana de *Staphylococcus aureus*, a literatura científica tem mostrado que este produto apresenta potencial de alterar algumas propriedades físicas e mecânicas dos polímeros utilizados na confecção de peças protéticas. Assim, a clorexidina pode não ser mais apropriada para o uso diário de desinfecção da prótese ocular. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar diferentes concentrações e imersão por um longo período.

A efetividade antimicrobiana do Triclosan tem sido testada em diferentes formulações comerciais contendo esse agente nas concentrações de 0,2 a 2%, embora estudos aleguem que as formulações contendo 1% de triclosan são apropriadas e ideais para o efeito antimicrobiano desejado.²⁰ A atividade antimicrobiana do Triclosan tem sido demonstrada ao longo de 25 anos de testes. O Triclosan difunde-se para a parede celular bacteriana e rompe a membrana citoplasmática de RNA, diminuindo a síntese de proteínas e de lipídeos, resultando em inibição microbiana.²¹ Os estudos utilizados para demonstrar a eficácia do triclosan incluem ensaios *in vitro* e *in vivo* e estudos de casos clínicos.^{22,23} Esses estudos vêm corroborar com os resultados encontrados em nosso trabalho, no qual o tratamento com Triclosan 1% foi eficaz para remoção do biofilme.

O tratamento da superfície das amostras com Sabão Neutro sob o método de fricção diminuiu os valores de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Staphylococcus aureus*. Sabemos que o sabão neutro utilizado neste estudo não tem ação desinfetante. Nesse caso grande parte do biofilme pode ter sido removido da superfície do material durante a lavagem por fricção manual com Sabão Neutro e água. Mas ainda uma parte pequena desse biofilme pode ter-se infiltrado pelas porosidades do material, continuando sua atividade metabólica.

Citronela ou *Cymbopogon nardus* é uma das espécies Cymbopogon, no qual o seu óleo essencial é amplamente utilizado na produção de óleo de citronela essencial, comida, bebida, produtos de perfumaria, sabão, produtos de higiene corporal e produtos farmacêuticos.²⁴ Muitos estudos têm relatado sobre as propriedades antifúngicas e antimicrobianas do óleo essencial de citronela. Hammer et al.²⁵ verificou que o óleo essencial de citronela como agente antimicrobiano inibiu vários tipos de agentes patogênicos humanos, tais como o *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*. No nosso estudo, o óleo essencial de Citronela também reduziu os valores de UFCs do *Staphylococcus aureus*, no entanto não foi o mais eficaz. Esse fato pode estar associado à obtenção de diferentes composições químicas desse óleo que estão diretamente envolvidas com as diferentes técnicas de extração, as fontes geográficas e fases de maturidade do *Cymbopogon nardus*.

Quanto às amostras tratadas com Efferdent, observou-se que o mesmo reduziu os valores de UFC/mL da superfície das amostras. Sabe-se que o Efferdent é um peróxido alcalino, que apresenta em sua composição agentes oxidantes, efervescentes, redutores da tensão superficial e quelantes que em contato com a água, tornam-se soluções produzindo dióxido de carbono ou oxigênio. Estudos anteriores confirmaram a capacidade destes produtos de promoverem desagregação da estrutura do biofilme, durante ação efervescente^{26,27}. No entanto, como ocorreu com as amostras tratadas com Sabão Neutro, o Efferdent parece ter somente removido a camada do biofilme, o que pode ter permitido que cepas do *Staphylococcus aureus* infiltrassem nas porosidades da resina acrílica continuando sua atividade metabólica.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo foi possível concluir que a desinfecção das amostras com Clorexidina 4% ou com Triclosan 1% foi eficaz na remoção do biofilme.

REFERÊNCIAS

1. Goiato MC, Fernandes AU, dos Santos DM, Barao VA. Positioning magnets on a multiple/sectional maxillofacial prosthesis. *J Contemp Dent Pract*. 2007;8(7):101-7.
2. Goiato MC, dos Santos DM, Bannwart LC, Moreno A, Pesqueira AA, Haddad MF, et al. Psychosocial impact on anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(1):113-9.
3. Song JS, Oh J, Baek SH. A survey of satisfaction in anophthalmic patients wearing ocular prosthesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(3):330-5.
4. Paranhos RM, Batalhao CH, Semprini M, Regalo SC, Ito IY, de Mattos MG. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. *J Appl Oral Sci*. 2007;15(1):33-8.
5. Willcox MD. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2013;117:99-105.
6. Henriques M, Sousa C, Lira M, Elisabete M, Oliveira R, Azeredo J. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to silicone-hydrogel contact lenses. *Optom Vis Sci*. 2005;82(6):446-50.
7. Brothers KM, Nau AC, Romanowski EG, Shanks RM. Dexamethasone Diffusion Across Contact Lenses Is Inhibited by *Staphylococcus epidermidis* Biofilms in Vitro. *Cornea*. 2014;33(10):1083-7.
8. Scherer WJ, Lee K. Implications of early systemic therapy on the incidence of endogenous fungal endophthalmitis. *Ophthalmology*. 1997;104(10):1593-8.
9. Williams MA, McMullan R, Hedderwick S, Mulholland DA, Best RM. Diagnosis and treatment of endogenous fungal endophthalmitis. *Ophthalmologica*. 2006;220(2):134-6.

10. Goiato MC, dos Santos DM, Moreno A, Lyda MG, Rezende MC, Haddad MF. Effect of disinfection and storage on the flexural strength of ocular prosthetic acrylic resins. *Gerodontology*. 2012;29(2):e838-44.
11. Moreno A, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Bannwart LC. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. *Gerodontology*. 2013;30(1):32-9.
12. Pesqueira AA, Goiato MC, dos Santos DM, Haddad MF, Ribeiro Pdo P, Coelho Sinhoreti MA, et al. Effect of disinfection and accelerated aging on color stability of colorless and pigmented facial silicone. *J Prosthodont*. 2011;20(4):305-9.
13. Goiato MC, Dos Santos DM, Baptista GT, Moreno A, Andreotti AM, Bannwart LC, et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. *Gerodontology*. 2012.
14. Aiello AE, Larson EL, Levy SB. Consumer antibacterial soaps: effective or just risky? *Clin Infect Dis*. 2007;45 Suppl 2:S137-47.
15. Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*. 2000;28(2):184-96.
16. Tadtong S, Watthanachaiyingcharoen R, Kamkaen N. Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Alpinia galanga*. *Nat Prod Commun*. 2014;9(2):277-80.
17. Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol*. 1988;15(7):415-24.
18. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Dent Assoc* 2012;143(3):270-7.

19. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(5):1031-6.
20. Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*. 2000;28(2):184-196.
21. Meincke BE, Kranz RG, Lynch DL. Effect of Irgasan on bacterial growth and its adsorption into the cell wall. *Microbios*. 1980;28:133-47.
22. Jampani H, Lee A, Newman J, Jones R. A comprehensive comparison of the in vitro and in vivo antimicrobial effectiveness of triclosan, chlorhexidine, alcohol/chlorhexidine, and poloxamer iodine topical formulations [abstract]. *AJIC Am J Infect Control*. 1998;26:186.
23. Vischer WA, Regos J. Antimicrobial spectrum of Triclosan a broad spectrum antimicrobial agent. *Zentralbl Bakteriologie*. 1974;226:376-89.
24. Mickienė R, Bakutis B, Baliukonienė V: Antimicrobial activity of two essential oils. *Ann Agric Environ Med*. 2011;18:139–44.
25. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999;86:985–90.
26. Duyck J, Vandamme K, Muller P, Teughels W. Overnight storage of removable dentures in alkaline peroxide-based tablets affects biofilm mass and composition. *J Dent*. 2013;41(12):1281-9.
27. Freitas Fernandes FS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straioto FG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on *Candida* spp. biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *J Prosthet Dent*. 2011;105(1):51-8.