

# Evaluación antifúngica del ozono contra *Candida albicans*: estudio *in vitro*.

## *Antifungal evaluation of ozone against Candida albicans: in vitro study.*

Ricardo Peralta-Estrada,\* Iván Ponce-Torres,\* Daniel Coronado-Pérez,\*  
Francisco Javier Vázquez-González,‡ Alejandro Donohue-Cornejo,§  
Juan Carlos Cuevas-González,§ Salvador David Nava-Martínez,¶ Dalia Abril Guzmán-Gastelum,\*  
Eligio Valera-González,\* León Francisco Espinosa-Cristóbal§

### RESUMEN

**Introducción:** la *Candida albicans* (*C. albicans*) es un patógeno fúngico que puede causar infecciones superficiales o potencialmente mortales. Los biofilms de *C. albicans* muestran rasgos fenotípicos únicos, el más destacado es su notable resistencia a una amplia variedad de agentes antimicóticos. Una de las alternativas para inhibir el crecimiento de este microorganismo es el ozono debido a sus propiedades bactericidas, fungicidas y virucidas; sin embargo, escasa información ha sido reportada en *C. albicans*. **Objetivo:** el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto fungicida del ozono en *C. albicans*. **Material y métodos:** la metodología consistió en agregar ozono a tubos de ensayo con medios de caldo nutritivo en diversas concentraciones y tiempos de ozonización. El efecto fungicida fue determinado con la determinación del número de colonias de *C. albicans* en agar nutritivo a través de procedimiento microbiológicos estandarizados por triplicado. **Resultados:** todas las muestras con ozono mostraron adecuados niveles de inhibición de crecimiento del microorganismo. Además, el efecto fungicida del ozono se encontró para ser significativamente dependiente del tiempo de ozonización y de la concentración. **Conclusión:** el uso de terapia con ozono podría tener potencial en el control de infecciones micóticas causadas por la presencia de *C. albicans*.

**Palabras clave:** ozono, *Candida albicans*, inhibición de crecimiento.

### ABSTRACT

**Introduction:** *Candida albicans* (*C. albicans*) is a fungal pathogen that can cause superficial or life-threatening infections. Biofilms of *C. albicans* display unique phenotypic traits, the most prominent being their remarkable resistance to a wide variety of antifungal agents. One of the alternatives to inhibit the growth of this microorganism is ozone due to its bactericidal, fungicidal and virucidal properties; however, little information has been reported on *C. albicans*. **Objective:** the objective of this study was to evaluate the fungicidal effect of ozone on *C. albicans*. **Material and methods:** the methodology consisted in adding ozone to test tubes with nutrient broth media in various concentrations and ozonation times. The fungicidal effect was determined by determining the number of colonies of *C. albicans* in nutrient agar through standardized microbiological procedures in triplicate. **Results:** all the ozone samples showed adequate levels of growth inhibition of the microorganism. Furthermore, the fungicidal effect of ozone was found to be significantly dependent on ozonation time and concentration. **Conclusion:** the use of ozone therapy could have potential in the control of fungal infections caused by the presence of *C. albicans*.

**Keywords:** ozone, *Candida albicans*, growth inhibition.

\* Especialidad de Periodoncia, Departamento de Estomatología.

‡ Licenciatura en Biología.

§ Maestría en Ciencias Odontológicas, Departamento de Estomatología.

¶ Especialidad de Ortodoncia, Departamento de Estomatología.

Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

Recibido: 20 de enero de 2021. Aceptado: 03 de mayo de 2023.

**Citar como:** Peralta-Estrada R, Ponce-Torres I, Coronado-Pérez D, Vázquez-González FJ, Donohue-Cornejo A, Cuevas-González JC et al. Evaluación antifúngica del ozono contra *Candida albicans*: estudio *in vitro*. Rev ADM. 2023; 80 (3): 139-144. <https://dx.doi.org/10.35366/111431>



## INTRODUCCIÓN

El patógeno oportunista *Candida albicans* (*C. albicans*) es el hongo más frecuente aislado durante las infecciones orales, varios estudios han demostrado que diferentes bacterias orales se adhieren a este microorganismo en los biofilms orales y pueden modular su patogenicidad. Además, estas interacciones se describen como multidireccionales debido a la presencia de *C. albicans* u otras *Candida* spp. y su influencia en el comportamiento de la microbiota bacteriana.<sup>1,2</sup>

La candidiasis oral es una infección micótica importante en odontología y se deriva de enfermedades subyacentes, xerostomía, uso de prótesis y de antibióticos de amplio espectro, los cuales favorecen el crecimiento excesivo de la colonización endógena de *Candida*, esto provoca una infección oportunista que impacta seriamente en la alteración de la salud oral.<sup>3</sup>

Entre las especies de *Candida*, *C. albicans* es la principal especie relacionada con la candidiasis oral,<sup>4,5</sup> se han propuesto varios factores de virulencia por su patogenicidad. La adherencia a las células epiteliales bucales es un requisito previo esencial para la colonización de la mucosa bucal oral del huésped, mientras que la producción y la secreción de fosfolipasas y proteinasas ayudan a la invasión porque destruyen los componentes de fosfolípidos y proteínas de las membranas de las células del huésped.<sup>6</sup>

La levadura, *C. albicans* es un hallazgo frecuente debido a que es un patógeno oportunista en humanos y se puede aislar en 50 a 60% de las cavidades orales de los adultos jóvenes, variando su distribución de acuerdo a diversas condiciones sociodemográficas.<sup>7,8</sup> El tratamiento para los diversos tipos de candidiasis usa antifúngicos, principalmente nistatina (ungüento, suspensión oral), miconazol (gel y crema oral), clotrimazol (crema), anfotericina B (pastillas), entre otras.<sup>4</sup>

La existencia del biofilm de *C. albicans* puede exacerbar las infecciones clínicas al formar un reservorio para producir células patógenas recalcitrantes, que actúan como semillas para diseminar el organismo al torrente sanguíneo y provocar una infección sistémica invasiva. Además, los biofilms de *C. albicans* muestran rasgos fenotípicos únicos, el más destacado es que son notablemente resistentes a una amplia variedad de agentes antimicóticos clínicos, incluidos fluconazol y anfotericina B convencional.<sup>9</sup>

Actualmente, no existen medicamentos específicos para el biofilm de *C. albicans*, lo que hace que el tratamiento de las infecciones basadas en biofilms sea parti-

cularmente problemático.<sup>10</sup> El tratamiento exitoso de la candidiasis aún puede ser más obstaculizado donde hay un biofilm establecido y las infecciones por biomateriales siguen siendo un problema cada vez más alarmante debido a su obstinación intrínseca a la terapia convencional;<sup>11</sup> por lo tanto, existe una urgencia por desarrollar nuevos agentes antifúngicos contra los biofilms de *C. albicans*;<sup>12</sup> y debido a estas razones es necesario evaluar otras alternativas de tratamiento que ayuden a controlar y eliminar a la *C. albicans*, responsable de las infecciones micóticas en la cavidad oral.

El ozono es una forma gaseosa incolora de oxígeno y está presente en la atmósfera. Es uno de los gases más importantes en la estratosfera debido a su capacidad para filtrar los rayos ultravioletas, lo cual es crítico para el mantenimiento del equilibrio biológico en la biosfera.<sup>13</sup> Por otra parte, se ha utilizado para purificar el agua en todo el mundo durante muchos años, ya que es muy eficaz para eliminar bacterias, hongos, virus y parásitos en una concentración más baja.<sup>14</sup> El ozono es un compuesto químico que consta de tres átomos de oxígeno (oxígeno triatómico, O<sub>3</sub>), una forma energética más alta que el oxígeno atmosférico normal (O<sub>2</sub>), con un poderoso oxidante.<sup>15</sup> También se ha utilizado en medicina y odontología por sus propiedades antimicrobianas basadas en su fuerte efecto de oxidación con la formación de radicales libres, así como en la destrucción directa de casi todos los microorganismos.

En odontología el O<sub>3</sub> tiene una amplia aplicación que incluye el tratamiento de lesiones cariosas, desinfección del conducto radicular, cicatrización de heridas después de intervenciones quirúrgicas, control del biofilm de la placa, desinfección de dentaduras postizas, entre otras.<sup>14</sup> Algunos estudios han reportado que la forma acuosa de O<sub>3</sub> tiene potencial como agente antiséptico, porque genera menos citotoxicidad que el ozono gaseoso o antimicrobianos ya establecidos (digluconato de clorhexidina [CHX]: 2%, 0.2%; hipoclorito de sodio 5.25%, 2.25%; peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%), lo que cumple, además, con las características biológicas celulares óptimas en términos de biocompatibilidad para la aplicación oral.<sup>16,17</sup>

A pesar de la amplia información disponible en la literatura científica que sugieren el potencial del O<sub>3</sub> para el control de diversas infecciones, no existe suficiente información que determine claramente la propiedad antifúngica del O<sub>3</sub> contra el microorganismo *C. albicans* en pruebas in vitro. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel antifúngico del O<sub>3</sub> contra la *C. albicans* a través de evaluaciones microbiológicas in vitro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Preparación de las soluciones con O<sub>3</sub>

El método de ozonización usado en este estudio fue a través de un trabajo previamente reportado por Peralta y colegas, en el 2017,<sup>17</sup> el cual nos sirvió como guía para realizar la ozonificación del medio de cultivo variando exclusivamente el microorganismo a inhibir. Una vez que se tienen preparados los tubos de ensayo, previamente esterilizados y con el medio de cultivo, se les etiquetó con fecha y tiempo de exposición al ozono.

Para la aplicación del ozono se introdujo el aplicador del gas con una aguja al fondo del medio de caldo de cultivo (Standard II-Nährbouillon, Merck), al introducir la aguja empezó el burbujeo e inició también el conteo para su exposición, esto se realizó teniendo el mechero encendido para asegurar la esterilización en un radio de 30 cm. Al término del tiempo sólo se retiró el aplicador y se introdujo a un nuevo tubo ya preparado, se le aplicó el nuevo tiempo y así sucesivamente hasta llegar al último tiempo establecido. El equipo utilizado fue un sistema generador de ozono en corona, de la casa Carbar's (modelo 03AOD).

### Actividad de inhibición de crecimiento

Una vez que se tuvieron los tubos con el medio ozonizado el siguiente paso fue la inoculación de la cepa de *C. albicans*. Ésta se realizó teniendo el mechero encendido para asegurar la esterilización en un radio de 30 cm, con la micropipeta y puntas de 1 µL. Se agitó el medio donde se encontraba la cepa por unos segundos para realizar la toma, una vez obtenida la muestra requerida con la pipeta, se depositó en el medio previamente ozonizado, se cerró el tubo y se desechó la puntilla. Se repitió el proceso nuevamente a cada uno de los tiempos restantes, y así sucesivamente hasta llegar al grupo control positivo (medio nutritivo con microorganismos únicamente), en el cual se realizó una dilución de 1:1,000,000 para lograr hacer el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Finalmente, 1 µL de cada una de las suspensiones fue extendida en placas con agar nutritivo (MCD LAB), las cuales fueron preparadas por triplicado e incubadas por 24 horas a una temperatura de 37 °C para realizar el conteo de UFC/mL. La actividad de inhibición de crecimiento de la *C. albicans* fue determinada por el número de UFC/mL y por el porcentaje de inhibición de crecimiento, el cual fue determinado por una proporción del número de UFC/mL del grupo control positivo y las UFC/mL obtenidas por los diversos grupos de O<sub>3</sub>.

## Análisis estadístico

Los resultados de la actividad de inhibición de crecimiento fueron expresados en promedio, desviaciones estándar y porcentajes de acuerdo con las UFC/mL. El análisis entre grupos se realizó con el análisis de t de Student para grupos independientes paramétricos y las diferencias entre grupos fueron determinadas cuando  $p < 0.05$ . El programa estadístico utilizado fue IBM-SPSS Statistics versión 25.

## RESULTADOS

Los resultados de acuerdo a los tiempos de ozonización, así como la concentración de O<sub>3</sub> en la inhibición de *C. albicans* está descrita en la [Tabla 1](#). En general, la actividad de inhibición de crecimiento de la *C. albicans* se presentó a partir de los 350 y 400 s en una concentración de O<sub>3</sub> de 0.0494 y 0.0564, respectivamente.

En la [Tabla 2](#) se muestran los resultados del nivel de inhibición en el crecimiento de la *C. albicans* con O<sub>3</sub>. Una vez identificado el tiempo y concentración de O<sub>3</sub> en la cual comienza la inhibición del crecimiento del microorganismo, se realizaron evaluaciones usando tiempos de ozonización de 320, 340 y 350 s. El tiempo de ozonización fue dependiente de la concentración de O<sub>3</sub>, en el cual la concentración de ozono aumentó gradualmente con el avance del tiempo de ozonización (320 s = 0.0451 ppm, 340 s = 0.0479 ppm y 350 s = 0.0494 ppm).

Por otro lado, el uso de ozono generó diferentes niveles de inhibición de la *C. albicans* para todos los grupos.

**Tabla 1: Tiempos de ozonización y concentración de O<sub>3</sub> para la inhibición de crecimiento *C. albicans*.**

Tiempo (s)	Inhibición de crecimiento de <i>C. albicans</i>	Concentración de O <sub>3</sub> (ppm)
100	Negativo	0.0141
150	Negativo	0.0212
200	Negativo	0.0282
250	Negativo	0.0353
300	Negativo	0.0423
350	Positivo	0.0494
400	Positivo	0.0564

Tabla 2: Nivel de inhibición de crecimiento de *C. albicans* con O<sub>3</sub>.

Grupos (s)	UFC/mL*	Concentración de O <sub>3</sub> (ppm)	Porcentaje de inhibición (%)
320	940 ± 45.8 <sup>‡</sup>	0.0451	99.96
340	664 ± 98.3 <sup>‡</sup>	0.0479	99.97
350	0 ± 0 <sup>‡</sup>	0.0494	100.00
Control positivo	2'097,333 ± 54,601	0.000	0.00
Control negativo	0 ± 0	0.000	100.00

\* UFC/mL son expresados en promedios y desviación estándar. <sup>‡</sup> indica diferencias significativas con el grupo control positivo ( $p < 0.05$ ).

Aunque se puede apreciar un efecto de inhibición de crecimiento que aumenta gradualmente con el tiempo de ozonización y la concentración de O<sub>3</sub>, el nivel de inhibición de crecimiento de la *C. albicans* fue estadísticamente mejor en todos los tiempos de ozonización y concentraciones de ozono (940 ± 45.8, 664 ± 98.3 y 0 ± 0 UFC/mL, respectivamente), en comparación con el grupo control positivo (2,097,333 ± 54,601 UFC/mL) ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente, se puede observar que los porcentajes de inhibición de crecimiento de la *C. albicans* aumentaron con la presencia del O<sub>3</sub>, así como en sus tiempos de ozonización y concentraciones más altas.

En la *Figura 1* se muestran imágenes representativas de placas de agar nutritivo de *C. albicans* expuestas a ozono. Las imágenes de la placa de agar nutritivo muestran mayor cobertura de colonias de *C. albicans* en tiempos de ozonización y concentraciones más bajas (*Figura 1A*), seguidas de las condiciones de O<sub>3</sub> moderadas (*Figura 1B*), en las cuales se observan menor cantidad de colonias que en las concentraciones más bajas. Finalmente, el grupo con la ausencia total de colonias de *C. albicans* fue encontrado en los tiempos de ozonización y concentraciones de O<sub>3</sub> más altos (*Figura 1C*). Indudablemente, los resultados de la actividad de inhibición de crecimiento de la *C. albicans* dependen firmemente de la presencia, tiempo de ozonización y concentración de O<sub>3</sub>.

## DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que el uso de ozono tiene un efecto de inhibición en el crecimiento de *C. albicans* bajo condiciones in vitro, el cual se encontró estadísticamente asociado con el tiempo de ozonización y con la concentración del ozono en las soluciones. Estos resultados podrían sugerir el uso del ozono como una terapéutica

potencial para el control de infecciones orales fúngicas asociadas con *C. albicans*.

Hoy en día, existen cuatro principales tipos de fármacos antimicóticos para la mayoría de las infecciones, considerados como terapia tradicional farmacológica: los azoles, polienos, equinocandinas y análogos de nucleósidos. Los azoles (fluconazol) son los más recetados para infecciones micóticas sistémicas y tópicas. Los polienos (anfotericina B) son los fungicidas más antiguos disponibles para tratar infecciones graves. Las equinocandinas (caspofungina) son fungicidas contra la mayoría de las especies de *Candida*, son la clase más nueva de antifúngicos para tratar infecciones persistentes mediante la administración intravascular. Los análogos nucleósidos como la 5-flucitosina son antimetabolitos que limitan a los nucleósidos durante la síntesis de ácidos nucleicos interrumpiendo la síntesis de ARN, ADN y proteínas de los hongos.<sup>18</sup> Sin embargo, las infecciones por *C. albicans* suelen ser resistentes a la mayoría de las terapias farmacológicas convencionales.<sup>9</sup>

Existen terapias alternativas que han demostrado ser eficaces para el control de la *C. albicans*, por ejemplo, el uso de la curcumina como un fármaco anticandidial y que suele ser eficaz por la escasa solubilidad que presenta. Se ha sugerido que el tratamiento de la *C. albicans* se maneje en combinación con otros métodos, como la terapia fotodinámica, la cual ha demostrado ser mínimamente invasiva para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

La combinación de dos agentes antifúngicos con diferentes mecanismos de acción, como la química y la terapia fotodinámica, para complementar las deficiencias de uno y otro tratamiento, ha mostrado tener un efecto positivo en los pacientes.<sup>19</sup> No obstante, otros estudios han comprobado que la combinación de la terapia de

ozono y la fotodinámica no ofrecen una reducción adecuada de microorganismos que se encuentran sobre un biofilm bien estructurado.<sup>20</sup>

En la presente investigación observamos la inhibición del crecimiento de *C. albicans* por medio del contacto del O<sub>3</sub> a distintas concentraciones (0.0451, 0.0479 y 0.0494 ppm, respectivamente) y tiempos de generación en su forma gaseosa (320, 340 y 350 s). Es probable que el ozono haya generado reacciones a nivel molecular en el medio acuoso, al producir una oxidación de las paredes celulares y las membranas citoplasmáticas en el microorganismo de *C. albicans* y crear una permeabilidad aumentada para que las moléculas de ozono logren entrar adecuadamente, lo que da como resultado un daño físico en las estructuras superficiales de las células.<sup>20,21</sup>

Otros estudios también han demostrado efectos antifúngicos contra la *C. albicans*. El uso de productos naturales para el control de enfermedades micóticas ha obtenido resultados favorables mediante la interrupción de algunos mecanismos de acción, tal es el caso de los inhibidores de la síntesis de componente de la pared celular (quitina y manoproteínas), inhibidores de la síntesis de esfingolípidos (serina palmitoiltransferasa, ceramida sintasa, inositol fosfoceramida sintasa) e inhibidores de la síntesis proteica (sordarinas).

Otros autores han demostrado el control de *C. albicans* mediante el uso de productos naturales derivados de plantas como el pinosresinol que despolariza y forma poros en la membrana fúngica o mediante el uso del aceite de canela y el complejo del aceite de «pogostemon» que provoca irregularidades porosas en la superficie de *C. albicans*.<sup>19</sup>

En otros estudios se ha demostrado la efectividad de las burbujas de ozono con una concentración aproximada de 10 ppm como limpiador de dentaduras protésicas contra la *C. albicans*, al mostrar una reducción de hasta una décima parte en 30 min de exposición.<sup>22</sup> En este estudio, la inhibición en el crecimiento *C. albicans* se

mostró a partir de una exposición de 350 s a una concentración de ozono de 0.0494 ppm y a los 400 s con una concentración de 0.0564 ppm. Es bien sabido que el ozono posee la capacidad de tener una alta solubilidad por su gran facilidad de dispersarse en el agua y provocar una reacción en los ácidos grasos insaturados de la membrana fosfolípida que desencadena todo un proceso que conlleva a la liberación de oxígeno y causa la muerte de microorganismos.<sup>17</sup>

Debido a las limitaciones y deficiencias mostradas por los tratamientos convencionales, se ha optado por la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento que puedan generar efectos beneficiosos en el paciente y que no comprometan el estado de salud de éste. La ozonólisis es un proceso por el cual se lleva a cabo una oxidación de las células al generar irregularidades en las paredes citoplasmáticas y promover la destrucción de las paredes celulares, lo que da como resultado una mayor permeabilidad del microorganismo.<sup>20</sup>

El presente estudio demuestra la eficacia del ozono en una forma gaseosa contra la *C. albicans* y, al igual que otros gases como el O<sub>2</sub>, NO y CO, ha evidenciado tener una eficacia contundente; sin embargo, es necesario conocer las limitaciones con respecto a sus dosis y tiempos de exposición para evitar que se convierta en una opción terapéutica con repercusiones tóxicas.<sup>23</sup>

A pesar de que diferentes microorganismos se encuentren establecidos en un mismo entorno, la variable con respecto a los tipos de administración, las dosis y los tiempos de exposición dependerán del tipo de microorganismo específico por el cual se esté realizando el tratamiento.<sup>17</sup> El presente estudio ofrece al clínico un punto de partida basado en evidencia científica con respecto a las concentraciones adecuadas para el manejo de las enfermedades micóticas, pero no establece un protocolo generalizado debido a que el diseño de este estudio fue *in vitro*, lo que sugiere que se deben realizar futuras investigaciones de tipo clínico, además se debe seguir



**Figura 1:** Inhibición de crecimiento de *C. albicans* en diversas condiciones de O<sub>3</sub>. **A)** 320 s y 0.0451 ppm. **B)** 340 s y 0.0479 ppm. **C)** 350 s y 0.0494 ppm.

investigando el beneficio del ozono para el tratamiento de diferentes enfermedades y la búsqueda de diferentes alternativas para distintos procedimientos terapéuticos.

### CONCLUSIONES

Este estudio demostró que el ozono posee un efecto antifúngico significativo contra el microorganismo *C. albicans* bajo procedimientos *in vitro*, el cual es dependiente del tiempo y concentración durante la ozonización. Aunque el ozono podría representar una terapéutica antifúngica potencialmente efectiva para el control de infecciones micóticas orales asociadas con *C. albicans*, es necesario el desarrollo de nuevos protocolos de investigación para determinar el uso seguro en seres humanos.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Estomatología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) por su apoyo en el desarrollo de este estudio.

### REFERENCIAS

- Montelongo-Jauregui D, Lopez-Ribot JL. *Candida* interactions with the oral bacterial microbiota. *J Fungi*. 2018; 4 (4). doi: 10.3390/jof4040122.
- Cauchie M, Desmet S, Lagrou K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *Res Microbiol*. 2017; 168 (9-10): 802-810. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.005.
- Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011; 3 (2011): 0-11. doi: 10.3402/jom.v3i0.5771.
- Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J*. 2017; 223 (9): 675-681. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.886.
- Muadcheingka T, Tantivitayakul P. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(6): 894-901. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.002.
- Tantivitayakul P, Panpradit N, Maudcheingka T, Klaophimai A, Lapidattanakul J. Genotyping of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S rDNA analysis shows association with virulence attributes in oral candidiasis. *Arch Oral Biol*. 2019; 97: 18-24. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.006.
- Gündüz Arslan S, Akpolat N, Kama JD, Ozer T, Hamamci O. One-year follow-up of the effect of fixed orthodontic treatment on colonization by oral *Candida*. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37 (1): 26-29. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00574.x.
- Aguirre Urizar JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19 (1): 17-21.
- Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Graninger W, Presterl E. *In vitro* activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 65 (2): 271-274. doi: 10.1093/jac/dkp429.
- Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015; 69 (1): 71-92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.
- Tsui C, Kong E, MJ-R-FP, 2016 undefined. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *academic.oup.com*.
- Yan Y, Tan F, Miao H, Wang H, Cao YY. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms. *Front Microbiol*. 2019;10: 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2019.01085.
- Libonati A, Di Taranto V, Mea A et al. Clinical antibacterial effectiveness healozone technology after incomplete caries removal. *Eur J Paediatr Dent*. 2019; 20 (1): 73-78. doi: 10.23804/ejpd.2019.20.01.14.
- Razak FA, Musa MY, Abusin HAM, Salleh NM. Oxidizing effect of ozonated-water on microbial balance in the oral ecosystem. *J Coll Physicians Surg Pakistan*. 2019; 29 (4): 387-389. doi: 10.29271/jcsp.2019.04.387.
- Ozdemir H, Toket H, Balci H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontol Res*. 2013; 48 (6): 722-726. doi: 10.1111/jre.12060.
- Huth KC, Jakob FM, Saugel B et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114 (5): 435-440. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00390.x.
- Peralta ER, Vázquez GFJ, Portilla R et al. Efecto antimicrobiano de la terapia con ozono contra *Streptococcus sanguis* como tratamiento preventivo de enfermedad periodontal: estudio *in vitro*. *Rev Mex Periodontol*. 2017; 7 (3): 84-92. [Accessed June 4, 2018] Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=72651&IDPUBLICACION=7070&IDREVISTA=212&NO MBRE=Revista Mexicana de Periodontolog%EDa>
- Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016; 18 (5): 310-321.
- Hsieh Y-H, Zhang J-H, Chuang W-C et al. An *in vitro* study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. *Int J Mol Sci Artic*. doi: 10.3390/ijms19020337.
- Almaz ME, Sonmez I. Ozone therapy in the management and prevention of caries. *J Formos Med Assoc*. 2015; 114 (1): 3-11. doi: 10.1016/j.jfma.2013.06.020.
- Huth KC, Quirling M, Lenzke S et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci*. 2011; 119 (3): 204-210. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00825.x.
- Baysan A, Lynch E. The use of ozone in dentistry and medicine. *Prim Dent Care*. 2005; 12 (2): 47-52. doi: 10.1308/1355761053695158.
- Mauro R Di, Cantarella G, Bernardini R et al. The biochemical and pharmacological properties of ozone: the smell of protection in acute and chronic diseases. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (3): 634. doi: 10.3390/ijms20030634.

#### Correspondencia:

Dr. en C. León Francisco Espinosa-Cristóbal

E-mail: leohamet@hotmail.com