



ARTIGO ORIGINAL

Efeito *in vitro* de dispositivos de alta frequência: abordagem promissora no tratamento da acne vulgar? ☆, ☆☆☆



Leonie Frommherz ^a, Markus Reinholz ^{a,*}, Anne Gürtler ^a, Pia-Charlotte Stadler ^a, Till Kaemmerer ^a, Lars French ^{a,b} e Benjamin M. Clanner-Engelshofen ^a

^a Departamento de Dermatologia e Alergia, Ludwig Maximilian University, Munique, Alemanha

^b Departamento de Dermatologia & Cirurgia Cutânea Dr. Phillip Frost, University of Miami, Miller School of Medicine, Miami, Estados Unidos

Recebido em 1 de agosto de 2021; aceito em 21 de setembro de 2021

PALAVRAS-CHAVE

Acne vulgar;
Infecção bacteriana;
Microbioma;
Terapia de alta
frequência

Resumo

Fundamentos: A acne vulgar é doença inflamatória da pele que leva a um comprometimento da qualidade de vida e, portanto, não é apenas questão estética. Sua patogênese é multifatorial – de particular importância é a colonização pela bactéria *Propionibacterium acnes*. Há uma ampla gama de diferentes opções de tratamento, incluindo tratamentos tópicos e sistêmicos, dependendo da gravidade. A terapia de alta frequência (AF), desenvolvida historicamente no século XIX, alega efeitos antimicrobianos na pele com acne, mas faltam dados sólidos sobre sua eficácia e mecanismo de ação.

Objetivos: O objetivo principal deste estudo foi determinar a eficácia da terapia de AF na flora cutânea e *P. acnes in vitro* utilizando dispositivo comercial, bem como revisar estudos sobre o mecanismo de ação.

Métodos: A fonte de plasma foi investigada em relação às configurações elétricas, calor e desenvolvimento de ozônio. A flora bacteriana cutânea, isolados de fungos e *P. acnes* foram expostos à AF *in vitro* e comparados a controles não expostos, avaliando o número de colônias em placas de ágar. Para análise extra das espécies bacterianas da flora normal da pele, foi realizado o sequenciamento 16S. As análises estatísticas foram realizadas usando o test *t* não pareado para amostras armazenadas em linha.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.09.015>

☆ Como citar este artigo: Frommherz L, Reinholz M, Gürtler A, Stadler PC, Kaemmerer T, French L, et al. High-frequency devices effect in vitro: promising approach in the treatment of acne vulgaris? An Bras Dermatol. 2022;97:729–34.

☆☆ Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia e Alergia, University Hospital, Ludwig Maximilian University, Munique, Alemanha.

* Autor para correspondência.

E-mail: Markus.Reinholz@med.unimuenchen.de (M. Reinholz).

Resultados: O tratamento com AF levou a redução significativa de quase todas as espécies bacterianas e fúngicas investigadas no presente estudo. Além disso, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. acnes* diminuiu significativamente após o tratamento com AF em comparação aos controles *in vitro*.

Limitações do estudo: Os experimentos foram realizados apenas *in vitro*; para avaliar os efeitos clínicos, são necessários mais experimentos *in vivo*.

Conclusões: Os resultados coletados no presente estudo, embora *in vitro*, fornecem uma base mecanicista para a AF como opção de tratamento complementar para pacientes com acne. O tratamento também pode ter efeito benéfico em pacientes com Infecções cutâneas superficiais.

© 2022 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A acne vulgar afeta aproximadamente 80% dos adolescentes e, portanto, é um dos motivos mais comuns de consulta com um dermatologista.¹ A patogênese dessa doença inflamatória cutânea é multifatorial, incluindo aumento da produção de sebo, queratinização folicular alterada, colonização bacteriana por *Propionibacterium acnes* e inflamação.²⁻⁴ Ela é dividida em quatro graus, de leve (incluindo comedões e poucas pápulas inflamatórias) a grave (associando nódulos inflamatórios e formação de cicatrizes).⁵ Além disso, a acne é considerada doença estigmatizante que induz baixa autoestima e retraimento social, também refletido por alto escore no *Dermatology Life Quality Index* (DLQI), semelhante àquele de pacientes com psoríase vulgar.⁶ Assim, a demanda por tratamentos eficazes é particularmente alta. Há uma infinidade de opções de tratamento, desde medicamentos de venda livre até terapias orais, incluindo retinóides e antibióticos. Recentemente, os dispositivos de alta frequência ganharam cada vez mais atenção, alegando ajudar a drenagem linfática, prevenir a queda de cabelos e o desenvolvimento de rugas e, por fim, melhorar as lesões de acne. Esses dispositivos de alta frequência, coloquialmente denominados *violet wand* (VW), fornecem Plasma de Pressão Atmosférica Frio (CAPP, do inglês *cold atmospheric pressure plasma*). O CAPP tem múltiplas propriedades bioativas – por exemplo, pela liberação de partículas carregadas e radicais reativos (O₃, NO, NO₂).⁷ No início do século passado, a terapia de alta frequência (AF) já era conhecida como opção de tratamento versátil em pacientes com doenças infecciosas da pele, eczema e feridas. Além disso, até enxaquecas, neuralgia, tuberculose e muitas outras doenças foram tratadas por esse método.⁸ Provavelmente em decorrência do desenvolvimento dos antibióticos e por falta de dados sobre sua eficácia, tornou-se menos importante em meados do século passado. Não apenas por seus efeitos antimicrobianos como “antisséptico físico” mas também pelo aumento global de cepas bacterianas multirresistentes, a medicina do plasma é atualmente um campo emergente, e os estudos em andamento são onipresentes. Recentemente, foi demonstrado que os dispositivos de AF são mais eficazes do que os antissépticos comuns no ataque contra patógenos de feridas *in vitro*,^{7,8} questionando se a terapia de AF também pode ser benéfica na pele com propensão a acne e como ela afeta a flora comum da pele.

Materiais e métodos

Fonte de plasma

Neste estudo, o dispositivo *Signstek Portable High Frequency Machine* (Signstek, Full Rise LLC, Wilmington, DE/EUA) com marcação CE (aprovada para uso em seres humanos na Europa) foi utilizado. Consiste em dispositivo portátil com um regulador de intensidade na parte inferior e uma saída para conectar diferentes tubos de vidro preenchidos com hélio abaixo da pressão atmosférica. São fornecidos quatro tubos de vidro diferentes: um tubo em formato de pente para tratar o couro cabeludo, um tubo em formato de língua para áreas sensíveis (como olheiras, nariz ou lábios), outro em formato de cogumelo para grandes áreas (regiões frontal e dorsal) e um tubo curvo com ponta esférica para áreas regulares como a região bucinadora (fig. 1a).

Em todos os experimentos relatados aqui, o tubo curvo foi utilizado a uma frequência de trabalho de 50 Hz A intensidade foi regulada em 50%.

Medidas técnicas

A intensidade da corrente foi medida para três condições (potência baixa, média e máxima) utilizando amperímetro padrão (Multimeter ABB Metrawatt 2012). A tensão aplicada correspondia à da tomada elétrica (na Alemanha: 230 V).

Avaliação do desenvolvimento de calor

Para investigações adicionais sobre o mecanismo preciso de ação da fonte de plasma, uma câmera de imagem térmica (FLIR MS Technology C3, FLIR® Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, EUA) foi utilizada para detectar o potencial desenvolvimento de calor. As fotos foram tiradas após 1, 2 e 4 minutos de tratamento de uma placa de ágar com AF para se assemelhar a um experimento com bactérias.

Formação de ozônio

A concentração de ozônio (O₃) foi medida utilizando um detector de O₃ (Leory PM 2.5 O₃ Ozondetektor TVOC, Thingnovation, Shenzhen, China). A fonte de plasma foi ligada a 100% em uma sala com janelas e portas trancadas, de

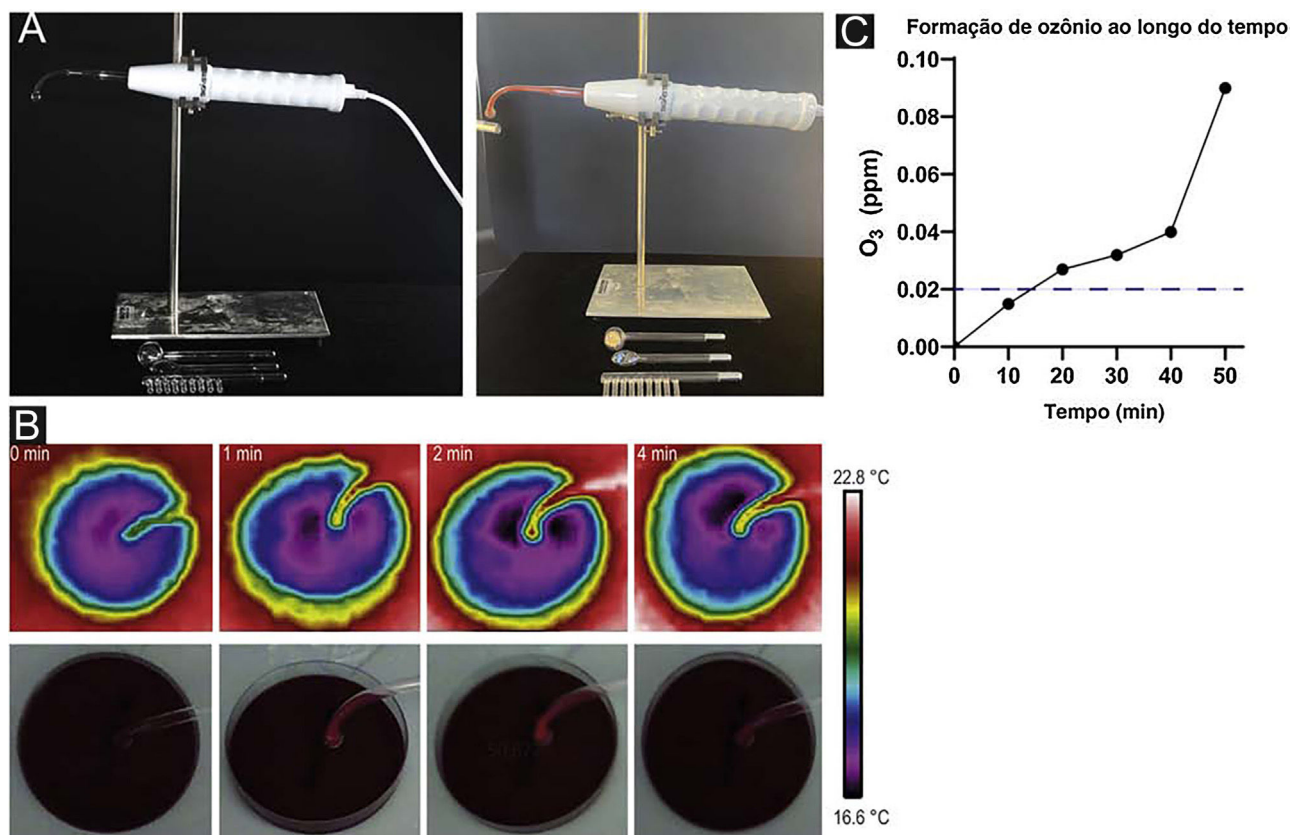


Figura 1 Fonte de plasma e efeitos do mecanismo. (A) O dispositivo de plasma é composto por um dispositivo portátil com ajuste de intensidade e diferentes tubos de vidro para conectar. Há formação de plasma de cor laranja quando ligado. (B) Fotos tiradas com câmera termográfica após 0, 1, 2 e 4 minutos sem nenhum sinal de desenvolvimento de calor. (C) Formação de ozônio durante o tempo medido por um detector de O₃ demonstrando aumento da concentração de O₃ já depois de 10 minutos. A linha tracejada indica a concentração limite de odor para ozônio (20-40 µg/m³; 0,01-0,02 ppm).

aproximadamente 10,5 m³. Os tempos de medida foram aos 10, 20, 30, 40 e 50 minutos.

Microbiologia

Bacteriologia

Para estudar os efeitos da terapia de AF sobre as bactérias, foram obtidos swabs de pele saudável em três áreas diferentes do corpo (região frontal, antebraço e área genital) de um indivíduo saudável. Em um segundo experimento, *Propionibacterium acnes* (ATCC® 6919™) foi testado separadamente.

Micologia

Para avaliar adicionalmente os efeitos sobre fungos, isolados clínicos de *Trichophyton mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. mentagrophytes*, *T. benhamiae*, *T. rubrum* e *Microsporum canis*, preparados por assistentes médico-laboratoriais, foram tratados conforme mencionado a seguir.

Culturas de bactérias/fungos

A flora da pele de três diferentes áreas do corpo foi isolada em placas de ágar sangue e incubada por 24 horas a 37 °C antes do tratamento com AF.

Propionibacterium acnes, como bactéria anaeróbica, foi cultivada em um frasco anaeróbico (BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vial) até atingir densidade celular aproximada de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL referente ao padrão McFarland n° 1, e em seguida tratada com AF em uma placa de ágar sangue. Após o tratamento, as placas foram incubadas por sete dias a 37 °C em condições anaeróbicas usando BD GasPak™. Espécies fúngicas foram cultivadas em BD Dermatophyte Agar por sete dias a 37 °C antes do tratamento.

Modelo in vitro para testes de alta frequência em bactérias/fungos

Após a incubação, cada colônia investigada foi ressuspensa em aproximadamente 0,5 mL de solução salina 0,9% estéril. Para a flora da pele, foram escolhidas cinco colônias de aparência morfológicamente diferente para avaliação posterior. Em seguida, 1 µL da solução microbiana foi aplicado centralmente nas placas de ágar apropriadas em pares. Em seguida, o dispositivo de AF com o tubo curvo anexo e desinfetado com lenço umedecido foi fixado em um suporte a uma distância de 5 mm acima da placa. De cada par, uma placa foi tratada por 1 minuto, enquanto a outra serviu como controle para determinar a diferença relativa. No caso de *P. acnes*, os períodos de tratamento variaram entre 1 e

8 minutos (1, 2, 4 e 8 minutos de tratamento de AF). Subsequentemente, a solução microbiana de placas tratadas e não tratadas foi espalhada utilizando esferas de vidro esterilizadas, seguido por um período de incubação a 37 °C por um dia para a flora da pele e sete dias para *P. acnes* e fungos. Após a incubação, em placas com aproximadamente mais de 1.000 colônias, três áreas de 1 cm² foram contadas em cada placa de ágar, e os valores médios foram multiplicados pelo tamanho da placa de ágar (57 cm²) para obter o número absoluto de colônias por placa. Placas com 100 a 1.000 colônias foram divididas em quartos, e um quarto contado foi multiplicado por quatro, enquanto placas com menos de 100 colônias foram contadas de maneira completa.

Sequenciamento 16S

As colônias bacterianas de cada par de placas foram ainda caracterizadas por meio de PCR (Kit HotStarTaq Master Mix, Qiagen), como descrito anteriormente.⁹

Os primers 27f (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC A-3') e 1492r (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') amplificaram parcialmente o rRNA do gene 16S usando um termociclador (Biometra Professional Basic, Analytik Jena GmbH, Jena, Alemanha).

Os produtos de DNA foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% para confirmar uma amplificação bem sucedida. O sequenciamento de Sanger foi realizado pela Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha) utilizando o primer 27f. As sequências obtidas foram alinhadas usando a ferramenta online BLASTn para identificar as espécies (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; NCBI).¹⁰

Análise estatística

Para observação e análises estatísticas (teste *t* de Student não pareado para amostras armazenadas em linha) foi utilizado o GraphPad Prism (versão 9.0.0, GraphPad Software Inc, San Diego, CA/USA) e os dados foram dispostos em gráficos em escala logarítmica. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores a seguir são apresentados como média ± desvio padrão. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ foram considerados altamente significativos (***).

Resultados

Avaliação de dados técnicos e mecanismo de ação

Para avaliar a intensidade da corrente elétrica durante o tratamento, foi utilizado um multímetro mostrando corrente variando de 0,28 (potência total) a 0,32 ampère (potência baixa) na tensão de 230 V.

O desenvolvimento de calor após 1, 2 e 4 minutos de tratamento com AF não foi observado. As fotos tiradas com câmera termográfica não mostraram alterações na temperatura durante o período investigado (fig. 1 B).

A formação de ozônio com concentração de 0,015 ppm foi observada após 10 minutos do dispositivo totalmente ligado. Após 20 minutos, as concentrações de O₃ quase dobraram ($c = 0,027$ ppm). Com tempos maiores os níveis

de concentração aumentaram ($c = 0,032$ após 30 minutos, $c = 0,040$ após 40 minutos, $c = 0,090$ após 50 minutos; fig. 1 C).

Efeitos da terapia de alta frequência contra a flora cutânea

Para avaliar a eficácia da terapia de AF contra a flora comum da pele, as placas de ágar sangue com e sem tratamento de AF foram contadas após o período de incubação seguido por PCR para especificar as espécies bacterianas. Em termos gerais, para quase todas as espécies identificadas, observou-se redução significativa na contagem de colônias. Mais precisamente, na região frontal, detectamos duas vezes *Micrococcus yunnanensis*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus capitis*. *Micrococcus yunnanensis* foi reduzido em 67,5% (31267,0 ± 81,7 vs. 1016,3 ± 57,1; $p < 0,001$) e na segunda placa em 12,5% (6405,0 ± 18,5 vs. 5605,3 ± 19,4; $p < 0,001$), *A. viridans* em 26,1% (9339,0 ± 72,1 vs. 6906,3 ± 58,8; $p < 0,001$), *S. epidermidis* em 83,43% (3785,7 ± 68,7 vs. 627,3 ± 18,2; $p < 0,001$) e *S. capitis* em 41,9% (1488,0 ± 70,4 vs. 864,3 ± 30,3; $p < 0,001$).

O mesmo foi observado para as bactérias do antebraço: *B. cereus* foi reduzido em 75,9% (11396,3 ± 757,7 vs. 2750,7 ± 127,9; $p < 0,001$), *S. capitis* em 63,9% (2700,3 ± 104,0 vs. 973,7 ± 25,1; $p < 0,001$), *A. urinaeequi* em 95,1% (16201,0 ± 757,9 vs. 800,0 ± 35,0; $p < 0,001$), *M. yunnanensis* em 99,0% (7209,3 ± 344,8 vs. 75,0 ± 12,8; $p < 0,001$) e *M. luteus* em 3,1% (6280,0 ± 443,3 vs. 6087,7 ± 119,3; $p = 0,5$).

Em relação às espécies bacterianas na região genital, *S. capitis* foi reduzido em 81,6% (31699,3 ± 763,7 vs. 5839,7 ± 111,3; $p < 0,001$), *S. lugdunensis* em 97,6% (15214,3 ± 405,1 vs. 363,3 ± 16,2; $p < 0,001$), *M. luteus* em 17,9% (957,0 ± 37,6 vs. 785,3 ± 22,3; $p = 0,002$), *S. haemolyticus* em 99,0% (6684,0 ± 273,0 vs. 70,0 ± 7,2; $p < 0,001$), *M. yunnanensis* em 70,3% (4322,0 ± 252,3 vs. 1284,3 ± 86,4; $p < 0,001$; fig. 2 A).

Efeitos da terapia de alta frequência contra dermatófitos

O próximo passo do presente estudo foi avaliar adicionalmente os efeitos do tratamento da AF contra uma seleção aleatória de dermatófitos. O número total de colônias de todos os dermatófitos foi significativamente reduzido em 58,0% após o tratamento com AF (55,8 ± 33,6 vs. 18,2 ± 6,5; $p = 0,040$). Mais precisamente, as colônias de *T. mentagrophytes* foram reduzidas em 61,5% (69,3 ± 4,0 vs. 26,7 ± 3,1; $p < 0,001$), de *T. violaceum* em 78,6% (103,0 ± 6,6 vs. 22,0 ± 3,0; $p < 0,001$), de *T. benhamiae* em 45,2% (17,7 ± 1,5 vs. 9,7 ± 1,5; $p = 0,003$), de *M. canis* em 69,1% (65,7 ± 2,1 vs. 20,3 ± 1,5; $p < 0,001$) e de *T. rubrum* em 61,6% (31,3 ± 1,5 vs. 12,0 ± 2,0; $p < 0,001$; fig. 2 B).

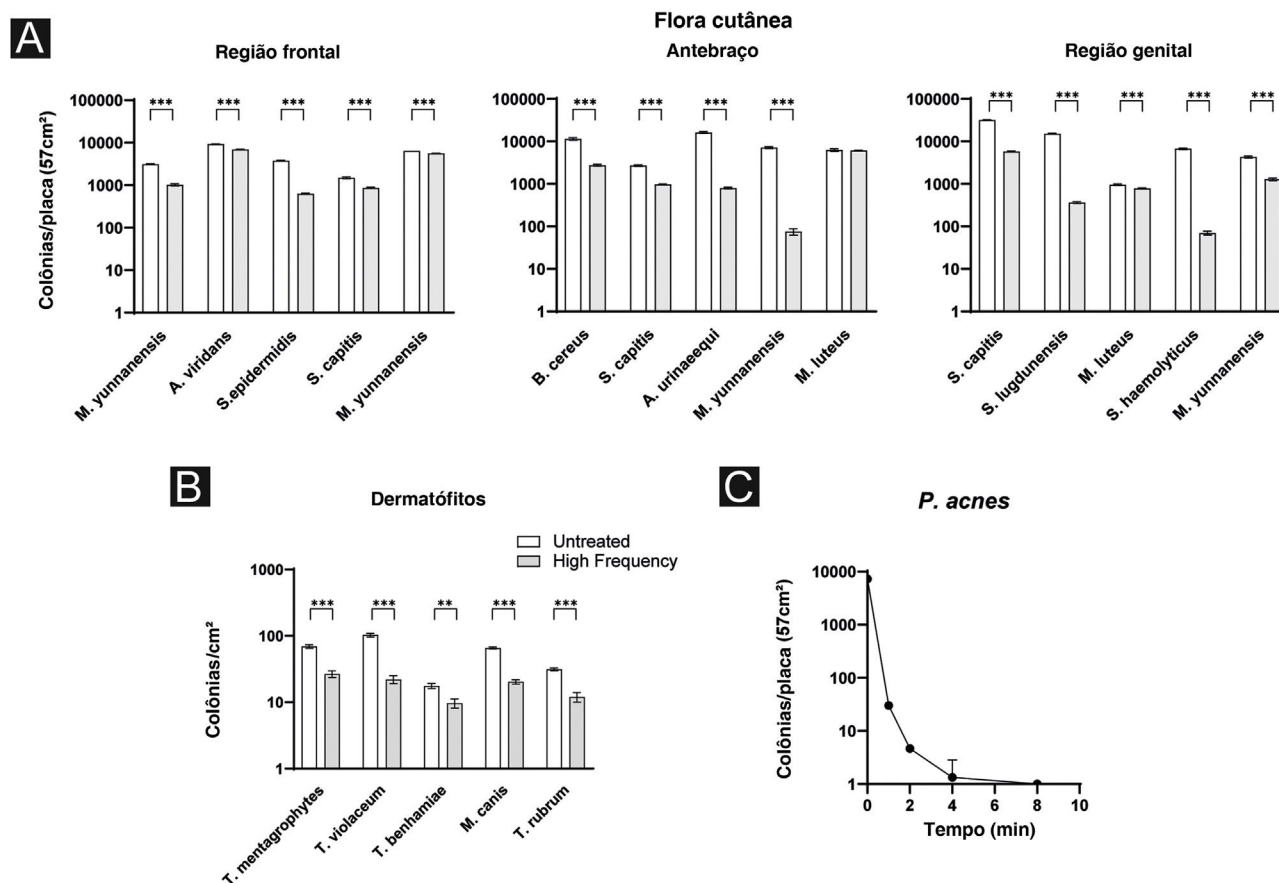


Figura 2 Efeitos antimicrobianos da terapia de AF. (A) Tratamento com AF mostra diminuição significativa da contagem de bactérias e (B) fungos *in vitro*. (C) UFC de *P. acnes* são significativamente reduzidas após 1 minuto, e a continuação do tratamento leva a redução adicional.

Efeitos da terapia de alta frequência contra *P. acnes*

Uma abordagem adicional para verificar se o tratamento de AF é benéfico contra *P. acnes*, este foi tratado por AF ao longo do tempo (fig. 2 C). As UFC em diferentes placas de ágar sangue foram contadas antes e após 1, 2, 4 e 8 minutos de tratamento com AF. Resultados significativos foram alcançados após 1 minuto de tratamento ($7288,0 \pm 145,9$ vs. $30,0 \pm 3,6$; $p < 0,001$). A continuação do tratamento por 2, 4 e 8 minutos levou a diminuição ainda maior da quantidade de UFC. Ao comparar os valores após 2 e 4 minutos de tratamento, observou-se redução ainda mais significativa do número de UFC de *P. acnes* ($4,7 \pm 0,6$ vs. $1,3 \pm 1,5$; $p = 0,020$). O tratamento prolongado por mais de 8 minutos pareceu não ter benefícios adicionais ($1,3 \pm 1,5$ vs. 1 ± 0 ; $p = 0,700$; fig. 2 C).

Discussão

No presente estudo, o tratamento com AF demonstrou efeito microbicida na flora da pele e patógenos *in vitro*, com diminuição significativa nas contagens bacterianas e fúngicas após curto período de tratamento.

Embora tenha sido demonstrado que os dispositivos de AF não funcionem por meio do desenvolvimento de calor, foi observado aumento da formação de O_3 durante o tempo de aplicação, sugerindo que seus principais efeitos antimicrobianos são provavelmente mediados pelo desenvolvimento de gás ozônio e, portanto, estresse oxidativo para os micróbios. Sabe-se que o O_3 tem efeito anti-inflamatório com propriedades antimicrobianas.^{11,12} Em altas concentrações (geralmente $> 200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $> 0,1$ ppm) por períodos prolongados de tempo, o O_3 pode contribuir para o desenvolvimento de doenças pulmonares, como DPOC ou enfisema,^{13,14} mas a quantidade de O_3 no tratamento de AF é muito pequena e o tempo de aplicação muito curto para causar problemas de saúde. Foi possível demonstrar que a flora cutânea de três áreas diferentes do corpo, incluindo diferentes bactérias aeróbicas, foi significativamente reduzida após 1 minuto de tratamento com AF. De acordo com o que foi mostrado, um estudo anterior demonstrou erradicação completa *in vitro* de isolados de feridas bacterianas.⁸ Além disso, os resultados do presente estudo estão de acordo com os achados de um estudo de 2015, mostrando que CAPP e VW podem reduzir uma variedade de bactérias, incluindo cepas multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (ESBL), bem como fungos, como a levedura *Candida albicans*. Os efeitos antimicrobianos da VW não diferiram de

maneira relevante dos dispositivos modernos de AF.⁷ O presente estudo e estudos anteriores destacaram claramente as propriedades antissépticas das terapias de AF, sugerindo que a AF, no lugar de antibióticos, pode ser opção de tratamento antimicrobiano alternativo para infecções superficiais de fácil acesso, especialmente porque as cepas bacterianas multirresistentes estão aumentando. Além disso, o efeito antimicrobiano também é importante para a redução da colonização por *P. acnes*, pois foi possível demonstrar redução significativa após 1 minuto de tratamento com o dispositivo de AF. Uma vez que *P. acnes* é uma causa chave na patogênese da acne vulgar, sua redução pode representar importante opção de tratamento complementar.

Conclusão

Os resultados coletados neste estudo, embora *in vitro*, fornecem uma base mecanicista para a AF como opção de tratamento complementar para pacientes com acne. Também pode ter efeito benéfico em pacientes com infecções cutâneas superficiais. Como os resultados *in vitro* são promissores, mais estudos *in vivo* são necessários para comprovar a eficácia e a tolerabilidade na prática diária com seguimentos em longo prazo para monitorar possíveis efeitos colaterais.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Leonie Frommherz: Obteve e analisou os dados e redigiu o manuscrito.

Markus Reinholz: Obteve e analisou os dados e redigiu o manuscrito.

Anne Gürtler: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Pia-Charlotte Stadler: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Till Kaemmerer: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Lars French: Obteve dados, revisou-os e fez a revisão do manuscrito.

Benjamin M. Clanner-Engelshofen: Obteve e analisou os dados e redigiu o manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

1. Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol*. 2013;168:474–85.
2. Barbieri JS. A New Class of Topical Acne Treatment Addressing the Hormonal Pathogenesis of Acne. *JAMA Dermatol*. 2020;156:619–20.
3. Contassot E, French LE. New insights into acne pathogenesis: propionibacterium acnes activates the inflammasome. *J Invest Dermatol*. 2014;134:310–3.
4. Kurokawa I, Danby FW, Ju Q, Wang X, Xiang LF, Xia L, et al. New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol*. 2009;18:821–32.
5. Kraft J, Freiman A. Management of acne. *CMAJ*. 2011;183:E430–5.
6. Cresce ND, Davis SA, Huang WW, Feldman SR, et al. The quality of life impact of acne and rosacea compared to other major medical conditions. *J Drugs Dermatol*. 2014;13:692–7.
7. Daeschlein G, Napp M, Podewils S, Scholz S, Arnold A, Emmert S, et al. Antimicrobial Efficacy of a Historical High-Frequency Plasma Apparatus in Comparison With 2 Modern. Cold Atmospheric Pressure Plasma Devices. *Surg Innov*. 2015;22:394–400.
8. Napp J, Daeschlein G, Napp M, von Podewils S, Gumbel D, Spitzmueller R, et al. On the history of plasma treatment and comparison of microbiostatic efficacy of a historical high-frequency plasma device with two modern devices. *GMS Hyg Infect Control*. 2015;10. Doc08.
9. Clanner-Engelshofen BM, French LE, Reinholz M. *Corynebacterium kroppenstedtii* subsp. *demodicis* is the endobacterium of *Demodex folliculorum*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34:1043–9.
10. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–10.
11. Sharma M, Hudson JB. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am J Infect Control*. 2008;36:559–63.
12. Lovato ECW, Velasquez PAG, Oliveira CS, Baruffi C, Anghinoni T, Machado RC, et al. High frequency equipment promotes antibacterial effects dependent on intensity and exposure time. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2018;11:131–5.
13. Kim SY, Kim E, Kim WJ. Health Effects of Ozone on Respiratory Diseases. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2020;83:56–11.
14. Jerrett M, Burnett RT, Pope CA, Ito K, Thurston G, Krewski D, et al. Long-term ozone exposure and mortality. *N Engl J Med*. 2009;360:1085–95.