

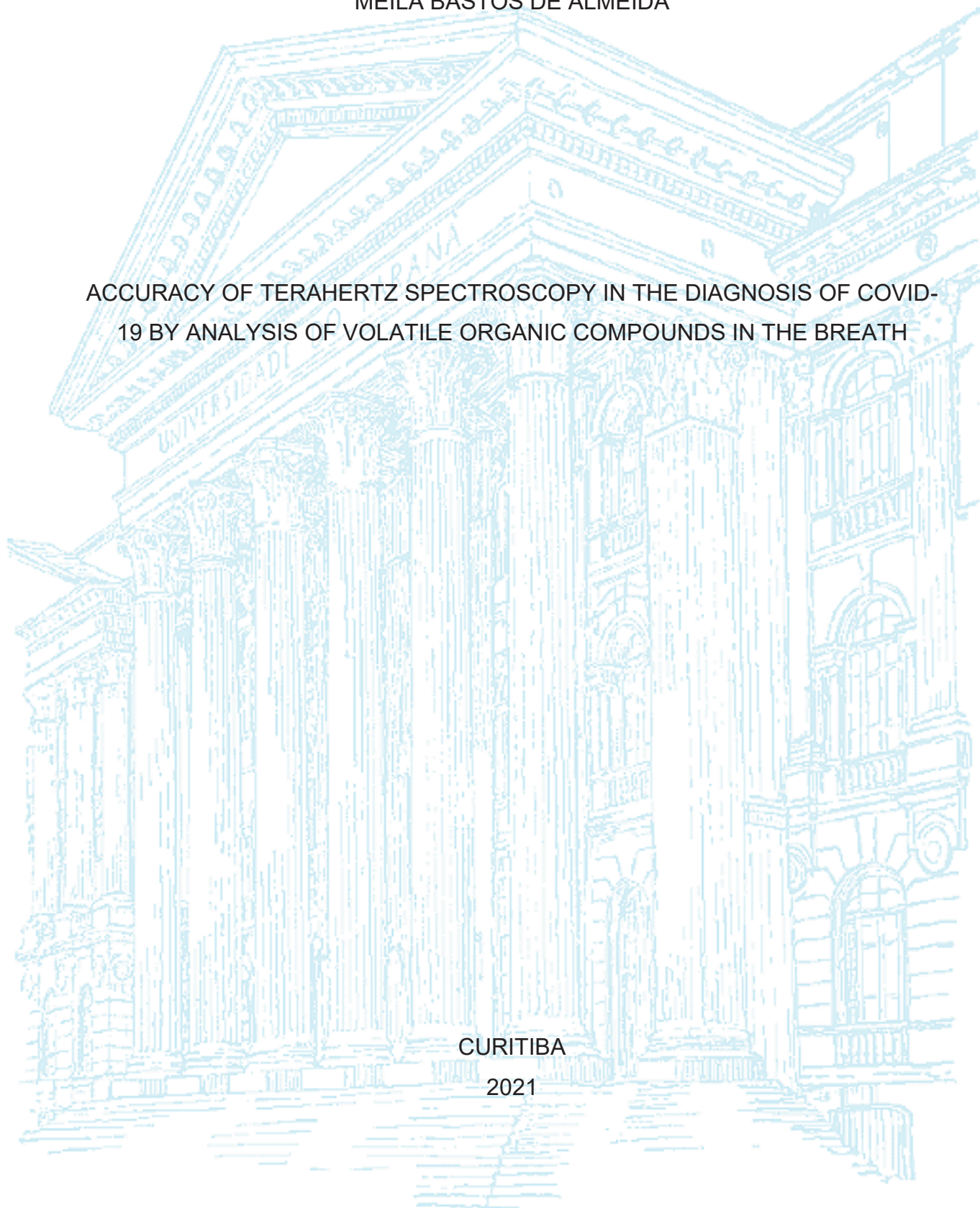
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MEILA BASTOS DE ALMEIDA

ACCURACY OF TERAHERTZ SPECTROSCOPY IN THE DIAGNOSIS OF COVID-19 BY ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN THE BREATH

CURITIBA

2021



MEILA BASTOS DE ALMEIDA

ACCURACY OF TERAHERTZ SPECTROSCOPY IN THE DIAGNOSIS OF COVID-19 BY ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN THE BREATH

(ACURÁCIA DA ESPECTROSCOPIA TERAHERTZ NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19 PELA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS NA RESPIRAÇÃO)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Diagnósticos, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

Coorientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2021

Almeida, Meila Bastos de
Acurácia da espectroscopia Terahertz no diagnóstico de Covid-19 pela
análise de compostos orgânicos voláteis na respiração. - Curitiba, 2021.
79f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Coorientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

1. SARS-CoV-2. 2. Radiação Terahertz. 3. Saúde Pública. I. Barros
Filho, Ivan Roque de. II. Biondo, Alexander Welker. III. Título. IV.
Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MEILA BASTOS DE ALMEIDA** intitulada: **ACCURACY OF TERAHERTZ SPECTROSCOPY IN THE DIAGNOSIS OF COVID-19 BY ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN THE BREATH.**, sob orientação do Prof. Dr. IVAN ROQUE DE BARROS FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

13/08/2021 17:56:12.0

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

12/08/2021 11:25:19.0

LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Assinatura Eletrônica

12/08/2021 10:56:03.0

ROSSANA BAGGIO SIMEONI
Avaliador Externo (INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/08/2021 11:50:19.0

FABIANO BORGES FIGUEIREDO
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ)

Assinatura Eletrônica

12/08/2021 08:56:48.0

JULIANO RIBEIRO
Avaliador Externo (PREFEITURA MUNICIPAL DE PIRAQUARA -
PARANÁ)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 106178

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 106178

AGRADECIMENTOS

À Deus, e a seu filho, por manterem toda a minha família viva! Jesus, tivemos nosso reencontro durante a pandemia e essa sempre será minha maior lembrança.

À minha família, que cuidou do Martim em 2020. Eu não conseguiria voltar para casa tranquila se ele estivesse lá.

Ao meu filho Martim, tão lindo, por todas as vezes que disse: tenho tanto orgulho de você, mãe!

Agradeço aos amigos, Ivan e Alex Biondo, pela orientação e confiança que sempre depositam em mim.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná, Tecpar, e seus Diretores, agradeço por todas as oportunidades que me foram dadas!

Esse Instituto me dá uma melhor amiga a cada ano. Tenho várias: Carol (minha primeira, rs), Luciana (a melhor amiga, mas me trocou pela Áustria), Giselle (essa é irmã, minha irmãzinha do coração), Letícia (incansável em me ajudar em tudo) e Elis. Elis, sem você eu não faria esse doutorado, sem você eu não seria o que me tornei nesses dois últimos anos. Monique, que não é do Tecpar mas foi o Tecpar que me deu e Louise, presentes que da vida!

Aos coautores do primeiro artigo publicado, fruto desse trabalho, agradeço as inúmeras contribuições. Aos médicos Marcelo e Jaime pelos artigos enviados, mas principalmente pela inspiração em realizar essa pesquisa clínica. Letícia, Elis e Cesar agradeço imensamente, pois escrevemos praticamente a quatro mãos. Aos meus orientadores, muito obrigada mais uma vez! E à Louise, que foi incrível na organização das referências e busca por artigos.

Todos Juntos

*“Esperteza, paciência
Lealdade, teimosia
E mais dia menos dia
A lei da selva vai mudar
Todos juntos somos fortes
Somos flecha e somos arco
Todos nós no mesmo barco
Não há nada pra temer
Ao meu lado há um amigo
Que é preciso proteger
Todos juntos somos fortes
Não há nada pra temer
E no, entanto, dizem que são tantos
Saltimbancos como nós”*

Saltimbancos - Chico Buarque

RESUMO

A espectroscopia Terahertz (THz) é uma tecnologia emergente que está trazendo uma série de avanços técnicos em diversas aplicações científicas na bioquímica. Esse trabalho apresenta a plataforma como alternativa diagnóstica no controle de agravos em saúde pública. Ameaças a saúde pública, como a atual pandemia, exigem ações imediatas por parte das autoridades e nesse sentido métodos diagnósticos rápidos e não invasivos podem ser usados como ferramenta de controle da disseminação de doenças. O presente trabalho avaliou um teste comercial de análise de respiração e detecção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) para detecção de pessoas infectadas com SARS-CoV-2 por THz associado a algoritmo. Por meio da realização de uma pesquisa clínica, submetida e aprovada pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa Clínica (CONEP), foram analisadas 500 amostras de pessoas saudáveis e 70 amostras de pessoas infectadas, previamente testadas por RT-qPCR. O teste mostrou sensibilidade de 92,6% e especificidade de 96,0%. Os resultados não mostraram correlação da positividade do SARS-CoV-2 com a infecção por outras doenças respiratórias, investigadas no estudo. Conclui-se que o método pode ser usado como teste de triagem para diagnóstico, rápido, local e de fácil aplicação, da Covid-19.

Palavras-Chave:

SARS-CoV-2. Algoritmo. Radiação Terahertz. Validação. Pandemia. Saúde Pública. Tecnologia. Inovação.

ABSTRACT

Terahertz (THz) spectroscopy is an emerging technology that is bringing a series of technical advances in several scientific applications in biochemistry. This study presents the platform as a diagnostic alternative in the control of diseases in public health. Threats to public health, such as the current pandemic, require immediate action by authorities and, in this sense, rapid non-invasive diagnostic methods and can be used as a tool to control the spread of diseases. The present work evaluated a commercial breath analysis test for the detection of volatile organic compounds (VOCs) for the detection of people infected with SARS-CoV-2 by THz associated with an algorithm. By conducting clinical research, submitted, and approved by the National Committee for Ethics in Clinical Research (CONEP), 500 samples from healthy people and 70 samples from infected people, previously tested by RT- qPCR, were analyzed. The test showed a sensitivity of 92.6% and a specificity of 96.0%. The results also showed no correlation between SARS-CoV-2 positivity and infection by other respiratory diseases investigated in the study . It is concluded that the method can be used as a rapid, local and easy-to-apply diagnostic screening test for Covid-19.

Key-Words:

SARS-Cov-2. Algorithm. Terahertz Radiation. Validation. Pandemic. Public Health. Technology. Innovation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA PARA VALIDAÇÃO DO TESTE BAT SARS-COV-2....	36
FIGURA 2 - CURVA ROC DA AMOSTRA TOTAL.	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPARAÇÃO DE COMPRIMENTOS DE ONDA ELETROMAGNÉTICOS E FONTE DE RADIAÇÃO.....	18
TABELA 2 -	DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS 570 SUJEITOS INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	37
TABELA 3 -	RESULTADOS DE RT-QPCR E BAT DA AMOSTRA TOTAL.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

THz	- Terahertz
RT-qPCR	- Transcrição reversa quantitativa da reação em cadeia de polimerase
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
RT-PCR	- Transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase
VOCs	- Compostos orgânicos voláteis
CONEP	- Comitê Nacional de Ética em Pesquisa Clínica
SARS-CoV-2	- Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2
COVID-19	- Doença coronavírus 2019
CDC-USA	- Centro de Controle e Prevenção de Doenças
Tecpar	- Instituto de Tecnologia do Paraná
SESA	- Secretaria de Saúde do Estado do Paraná
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LACEN	- Laboratório Central do Estado
HA	- Antígenos, Hemaglutinina
NA	- Neuraminidase
WHO	- Organização Mundial de Saúde (OMS)
UCI	- Unidades de Terapia Intensiva
PAV	- Pneumonia associada ao ventilador
BAT	- Teste de Análise da Respiração
FICF	- Formulário de Consentimento Livre e Informado
CI	- Intervalo de Confiança
PPV	- Valores Preditivos Positivos
NPV	- Valores Preditivos Negativos

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	12
2 ESPECTROSCOPIA TERAHERTZ APLICADA AO DIAGNÓSTICO EM SAÚDE PÚBLICA: UMA REVISÃO	17
2.1 INTRODUÇÃO	17
2.1.1 Aplicações na indústria alimentícia e meio ambiente	19
2.1.2 Aplicações em Biomedicina e Diagnósticos.....	19
2.1.3 Diagnóstico oncológico	20
2.1.4 Diagnóstico bacteriológico	22
2.1.5 Diagnóstico virológico	23
2.1.6 Aplicação potencial no diagnóstico SARS-CoV-2	24
2.2 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS.....	27
3 TESTE DE ANÁLISE DA RESPIRAÇÃO (TERA. BIO®) PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2 POR ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS BASEADOS NA TECNOLOGIA TERAHERTZ	32
3.1 INTRODUÇÃO	32
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.2.1 Descrição do método	33
3.3 RESULTADOS.....	36
3.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS.....	42
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
5 ANEXOS	46

1 APRESENTAÇÃO

Covid-19 é uma doença causada por uma nova cepa de coronavírus, SARS-CoV-2, que foi descoberta em 2019 e não foi identificada anteriormente em indivíduos. Por ter se espalhado globalmente, resultou em uma pandemia contínua. Este vírus respiratório é transmitido principalmente entre as pessoas enquanto elas estão em contato próximo, especialmente pelo ar. Os sistemas de saúde em todo o mundo estão sendo desafiados, como nunca na história recente, e é essencial enfatizar que a retomada das atividades suspensas de forma desordenada pode resultar em aumento da mortalidade (LI et al, 2020). Portanto, o diagnóstico rápido e a liberação de pessoas que testam negativo para a Covid-19 podem ajudar a mitigar essa crise, permitindo que instalações e organizações continuem funcionando (DIAS et al, 2020).

O método de diagnóstico padrão para SARS-CoV-2 é realizado por transcrição reversa quantitativa da reação em cadeia de polimerase (RT- qPCR) de uma amostra da nasofaringe coletada com cotonete. A taxa de falso-negativa para o teste SARS-CoV-2 RT-qPCR é altamente variável: maior nos primeiros 5 dias após a exposição (até 67%) e menor no dia 8 após a exposição (21%) (BROWNE et al, 2020). É considerado um diagnóstico invasivo devido à amostra biológica utilizada e pode levar até 24 horas para obter-se o resultado. Embora já possamos contar com testes moleculares rápidos por imunocromatografia “*points of care*”, com sensibilidade e especificidade semelhantes à RT-qPCR, amostras biológicas (soro) de pacientes ainda são coletadas invasivamente (CIOTTI, 2021).

De acordo com o Centro Americano de Controle e Prevenção de Doenças (CDC-EUA), devido às falsas taxas positivas e falsas negativas de testes sorológicos, eles não devem ser usados para diagnosticar, excluir ou relatar o *status* das infecções pelo SARS-CoV-2. Porém, o órgão governamental americano “*Food and Drug Administration*” (FDA), apesar disso, os profissionais de saúde devem usar testes sorológicos para detectar anticorpos ao SARS-CoV-2 e ajudar a monitorar pessoas que foram expostas ao vírus ou que se recuperaram de uma infecção (DIAS et al, 2020).

Como alternativa aos métodos diagnósticos não invasivos, os Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs) são bem estabelecidos para diferenciar uma pessoa

saudável de uma pessoa doente (DAS & PALM, 2020), principalmente em infecções pulmonares, sendo utilizados em pacientes hospitalizados. Entre os benefícios da análise de VOCs para o acompanhamento do paciente, está o fato de ser um método totalmente não invasivo (MAITIL et al, 2018). A respiração humana contém diferentes VOCs, representando processos metabólicos que fornecem informações sobre a química interna do corpo, além de possuir biomarcadores específicos para algumas doenças e demonstrar mudanças na química interna em doenças progressivas (MAITIL et al, 2019). Alguns gases endógenos podem ser identificados na análise dos VOCs do ar exalado, tais como: metano, isopreno, acetona, aldeído etc. (MAITIL et al, 2018). Metodologias de identificação de VOC, como cromatografia a gás e espectroscopia infravermelha são bem conhecidas. A cromatografia gasosa tem sido o método de detecção mais utilizado, mas é um método caro e não portátil (ITOH et al, 2016). A espectroscopia infravermelha tem sido amplamente utilizada, porém a umidade das amostras de ar exalado pode interferir com o resultado (MAITIL et al, 2018).

A espectroscopia Terahertz (THz) é uma opção para métodos de análise de componentes respiratórios quando comparados com espectros infravermelhos. Terahertz são ondas eletromagnéticas no espectro de radiação que estão entre a porção superior de micro-ondas a porção inferior do infravermelho, e, portanto, podem fornecer uma resolução maior diminuindo a interferência em amostras de água. Muitas moléculas polares, como a água, caem nesta região do espectro, e a propagação da onda THz pode ser muito sensível ao conteúdo dessas amostras onde a umidade está presente (SLOCUM et al, 2013).

Neste estudo, o THz é apresentado como um método alternativo para a detecção de pacientes positivos e negativos para Sars-CoV-2 através da análise de VOCs. O método inclui um dispositivo para coleta de partículas contidas em aerossol respiratório que é armazenado em uma cápsula que vai para o equipamento de análise THz. O método é não invasivo e tem um resultado rápido.

Além do THz, utiliza-se um banco de dados coletados a partir de estudos *in vitro* e pesquisas clínicas realizadas pela empresa detentora da tecnologia em outros países (no Brasil a pesquisa clínica foi realizada em parceria com o Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar) a partir de um modelo estatístico de *machine learning*, tornando o sistema capaz de diferenciar as amostras e definir o algoritmo

de modelagem que neste caso é determinístico (*prior art*, protegido por acordo de confidencialidade).

O método de diagnóstico inovador foi resultado da cooperação técnica e científica entre o Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar) com a empresa israelense TeraGroup LTD, junto à Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA). A empresa israelense foi responsável pela importação dos equipamentos e suprimentos por meio de sua subsidiária TeraBrasil Comercio de Materiais Médicos e Hospitalares Ltda, bem como pelo desembaraço aduaneiro. O Tecpar foi responsável pela realização e coordenação de pesquisas clínicas, incluindo a responsabilidade com as submissões ao Comitê Nacional de Ética em Pesquisa Clínica (CONEP) e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A SESA foi responsável pela captação de participantes do estudo clínico na rotina do Hospital Oswaldo Cruz, em Curitiba-PR, uma vez que o sistema *drive-thru* para coleta de cotonetes nasofaríngeos já havia sido implantado. Ainda sob responsabilidade da SESA, as provas de RT-qPCRs dos participantes foram realizadas no Laboratório Central do Estado (LACEN). O estudo clínico foi duplo-cego, ou seja, apenas o Tecpar avaliou os resultados tanto do método inovador, quanto do RT-qPCR, não compartilhando os resultados da RT-qPCR com a empresa israelense e não compartilhando os resultados da análise dos VOCs com o LACEN.

Com base na cooperação foi possível realizar um estudo clínico comparando os espectros analisados por Terahertz com os resultados da RT-qPCR de 570 participantes entre 9 e 22 de setembro de 2020. Tendo em vista que a taxa de casos positivos em Curitiba, na época, era de 25%, em ascensão, e como o equipamento foi importado apenas para a pesquisa que deveria ocorrer em 30 dias, considerou-se o número de 570 participantes, suficiente para realizar a pesquisa clínica duplamente cega e avaliar a precisão do método quando comparado com os resultados do RT-qPCR.

A revisão da literatura, segundo capítulo e primeiro artigo (publicado), foi realizada através do site <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, com a busca de 49 artigos que referenciavam a metodologia e suas diversas aplicações. O resumo dos artigos foram lidos e avaliados e os de maior relevância foram analisados na íntegra.

Observa-se que houve um rápido aumento na aplicação de THz em diversas áreas nos últimos anos, incluindo Biomedicina e Diagnóstico.

Materiais e métodos são apresentados no terceiro capítulo e segundo artigo (aceito para publicação) e demonstram que a análise de perfis de espectroscopia, em combinação com análise estatística e *machine learning*, definem o resultado positivo ou negativo para Sars-CoV-2. Informações confidenciais são protegidas por Acordo de confidencialidade e serão divulgadas com a publicação do artigo em parceria e coautoria das partes.

O objetivo deste estudo foi demonstrar a precisão do THz no diagnóstico do Covid-19 através da análise de VOCs de ar exalado e o resultado da pesquisa clínica está representado também no terceiro capítulo que relata o número de falsos positivos, falsos negativos, verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Esse resultado possibilitou o cálculo da especificidade e sensibilidade por meio de tabela de contingência.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da aplicação da espectroscopia de THz o no diagnóstico da Covid-19 para verificar a acurácia do método.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a sensibilidade do novo método de teste de análise da respiração (BAT) em comparação ao padrão ouro (RT-qPCR) no grupo geral e nos subgrupos de pacientes sintomáticos e assintomáticos;

Avaliar a especificidade do novo método (BAT) em comparação com o padrão ouro (RT-qPCR) no grupo geral e nos subgrupos de pacientes sintomáticos e assintomáticos;

Avaliar a correlação dos dois métodos diagnósticos através da análise ROC no grupo geral e nos subgrupos de pacientes sintomáticos e assintomáticos.

REFERÊNCIAS

BROWNE M, YARDIMCI NT, SCOFFONI C, et al, Prediction of Leaf Water Potencial

and Relative Water Content Using Terahertz Radiation Spectroscopy, **Wiley Online Library Journal**, 1-15, 2020.

CIOTTI M, Use of a Rapid Point-of-Care Molecular Test in the Triage of Suspected COVID-19 Cases, **Journal Medical Virology**, 4088-4089, 2021.

DAS S, PAL M, Review – Non-Invasive Monitoring of Human Health by Exhaled Breath Analysis: A Comprehensive Review, **Journal of The Electrochemical Society**, 1-22, 2020.

DIAS VMCH, CARNEIRO M, MICHELIN L, et al, Testes sorológicos para COVID-19 : Interpretação e aplicações práticas, **Journal of Infection Control**, 90–101, 2020.

ITOH T, MIWA T, TSURUTA A, et al, Development of na Exhaled Breath Monitoring System with Semiconductive Gas Sensors, a Gas Condenser Unit, and Gas Chromatograph Columns Toshio, **Sensors**, 2-16, 2016.

LI Q, GUAN X, WU P, et al., Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **N Engl J Med.**;382(13):1199–207, 2020.

MAITIL KS, LEWTON M, FILL E, et al, Sensitive Spectroscopic Breath Analysis by Water Condensation, **Journal os Breath Research**, 1-12, 2018.

MAITIL KS, LEWTON M, FILL E, et al, Human Beings as Islands os Stability: Monitoring Body States Using Breath Profiles, **Nature**, 1-8, 2019.

SLOCUM DM, SLINGERLAND EJ, GILES RH, et al, Atmospheric Absorption of Terahertz Radiation and Water Vapor Continuum Effects, **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, 49–63, 2013.

2 ESPECTROSCOPIA TERAHERTZ APLICADA AO DIAGNÓSTICO EM SAÚDE PÚBLICA: UMA REVISÃO (artigo publicado)

2.1 INTRODUÇÃO

Uma das áreas mais interessantes para a exploração de fenômenos naturais pode ser encontrada na região espectral de Terahertz (THz) (SHUMYATSKY & ALFANO, 2011). Recentemente, devido as propriedades únicas de emissão de THz, uma série de técnicas têm sido amplamente utilizadas em uma variedade de aplicações. A ressonância de frequência perceptível (impressões digitais ou assinaturas) de vários tamanhos pode estar localizada na faixa de frequências THz, prometendo impacto significativo sobre diferentes áreas (BOROVKOVA et al, 2018).

A radiação THz é uma frequência na magnitude de 1 trilhão de oscilações por segundo. O comprimento de onda correspondente é de cerca de alguns décimos de milímetro e está localizado no espectro de radiação eletromagnética entre a porção superior de micro-onda (comprimento de onda na faixa milimétrica) e a porção inferior de infravermelho (comprimento de onda em centésimo de milímetro) (YU et al, 2012; RONG et al, 2015). Isso resulta em uma série de propriedades ópticas ou semióticas (como a luz) e formas de propagação/penetração em comparação outras ondas eletromagnéticas (DABOUIS et al, 2009).

A radiação THz pode ocorrer naturalmente em nosso ambiente, como parte do espectro solar e por radiação natural na atmosfera terrestre. Apesar de tal abundância, o caráter não ionizante desta radiação e a falta de emissores práticos de THz deixaram o significado biológico desta região do espectro eletromagnético relativamente inexplorado por algum tempo. Propriedades distintas, juntamente com o desenvolvimento de novas fontes de THz e o amplo espectro de aplicação atual, apresentaram condições ideais para a compreensão das interações entre radiação THz e biomoléculas (BOCK et al, 2010).

A região do espectro eletromagnético, com frequências de ondas localizadas entre aproximadamente 300 GHz e 10THz (Tabela 1), tem uma característica intrigante assim como os semicondutores, como transistores e lasers, que geram radiação em frequências acima e abaixo dessa faixa, respectivamente (SIRTORI, 2002). Esta gama nomeada de *TeraHertz GAP* teve avanços consideráveis na última

década no desenvolvimento de equipamentos, o que permitiu vislumbrar uma ampla aplicação de campo.

Tabela 1 – Comparação de comprimentos de ondas eletromagnéticas e fontes de radiação

Região do Espectro eletromagnético	Faixa de Frequência (HZ)	Fonte de Radiação
Ondas de Rádio	$< 3,0 \times 10^9$	Eletrônica
Microondas	$3,0 \times 10^9$ a 300×10^9	
TeraHertz Gap	300×10^9 a 10×10^{12} or 300 GHz a 10 THz	Optoeletrônica
Infravermelho	10×10^{12} a $4,3 \times 10^{14}$	Ótica
Visível	$4,3 \times 10^{14}$ a $7,5 \times 10^{14}$	

As aplicações da tecnologia TeraHertz em larga escala foram restritas e representam um desafio para os cientistas (CHEVALIER et al, 2019). Técnicas optoeletrônicas THz podem ser necessárias aos componentes e sistemas THz devido ao potencial de geração e detecção de sinais THz razoáveis. Diferentes ferramentas optoeletrônicas podem ter contribuído para o desenvolvimento de sistemas THz com menor tamanho e preço (VIEIRA et al, 2016).

As fontes de radiação THz geralmente utilizadas compreendem: a) multiplicadores harmônicos de fontes de micro-ondas b) eletrônica de vácuo c) super contínua gerado por lasers ultrarrápidos e interruptores fotocondutivos, e d) mistura de frequência de diversos lasers de ondas contínuas (CHEVALIER et al, 2019). Estudos recentes mostraram diferentes fontes de radiação THz, por exemplo: a) plasma de ar (FENG et al, 2020); b) spintrônico de última geração ultra-bandalarga (XU et al, 2020); e c) Laser molecular de fase gasosa (CHEVALIER et al, 2019).

Diferentes técnicas de espectrometria podem adquirir dados de amostras de diferentes níveis, levando a dados espectrais complexos. Informações ocultas nesses dados podem ser usadas em uma combinação com algoritmos de modelagem eficiente. O algoritmo de modelagem é um método de desenvolvimento rápido que pode extrair as características das informações, classificá-las e caracterizá-las de forma eficiente. Com o rápido desenvolvimento do algoritmo, mais estudos com foco na implementação da detecção de objetos, classificação de imagens e outros campos da visão computacional (ZHANG et al, 2020).

2.1.1 Aplicações na indústria alimentícia e meio ambiente

Devido às características descritas, a identificação de moléculas através da identificação de ondas de THz tem se mostrado inovadora e promissora, altamente explorada na indústria alimentícia, por exemplo. A espectroscopia Terahertz (THz) tem sido usada para identificar proteínas em alimentos processados, uma vez que o aquecimento pode afetar a estabilidade de proteínas em técnicas de extração molecular (XIE et al, 2014). A espectroscopia de absorção de Terahertz foi utilizada com sucesso na análise qualitativa para diferenciar três isômeros trealose, um açúcar não totalmente redutor da indústria alimentícia (HUANG et al, 2020).

Uma das primeiras aplicações utilizando espectrometria THz tem acontecido na identificação de ovos fecundados imediatamente após a fecundação, devido às suas alterações conformacionais, permitindo uma economia significativa nos custos da indústria (KHALIDUZZAMAN et al, 2020). Outro uso potencial da espectrometria THz é o monitoramento e quantificação de moléculas de carboidratos nas plantas, identificando um pico no espectro THz relacionado a esse carboidrato. As sementes de arroz transgênicas podem ser identificadas com uma excelente taxa de garantia devido a alterações conformacionais de suas moléculas de carboidratos (ZHANG et al, 2020). Além disso, o THz pode ser capaz de determinar o estado hídrico das plantas em condições de seca (BROWNE et al, 2020).

Outra aplicação da metodologia THz é o controle ambiental. Água e esgoto são uma preocupação importante para a saúde pública. Vários microrganismos prejudiciais podem poluir diferentes fontes de água e espécies relacionadas precisam de um desinfetante capaz de removê-los da água contaminada. Alguns estudos têm mostrado a utilização de nanopartículas ricas em magnésio ou zinco com efeito inibidor em tal microbiota. Os mesmos estudos indicaram a possibilidade de identificação dessas nanopartículas na água, por radiação THz, aplicadas ao controle de qualidade (EL NAHRAWY et al, 2019). Em um estudo recente, a THz mostrou eficiência para medir vários lipídios sintetizados pelo *Scenedesmus obliquus*, microalga e uma fonte renovável de biodiesel (SHAO et al, 2020) .

2.1.2 Aplicações em Biomedicina e Diagnósticos

O número de aplicações de THz em áreas biológicas e médicas tem

aumentado significativamente nos últimos anos devido à sua sensibilidade sem precedente ao conteúdo da água em tecidos animais (HERNANDEZ-CARDOSO et al, 2017). Estudo experimental mostrou que a irradiação de THz pode aumentar a motilidade do esperma associado à concentração intracelular de cálcio. Este resultado destaca o THz como uma tecnologia reprodutiva potencial para melhorar a atividade *in vitro* do esperma (WEI et al, 2018).

Os primeiros estudos na região de THz sobre o contraste entre tecidos saudáveis e doentes têm focado em alterações relacionadas a esse conteúdo (essencial para tecidos saudáveis) (SUN et al, 2017). Já foram descritas medidas de concentração de água em várias amostras que aplicam THz, mostrando resultados promissores com análise precisa do conteúdo da água (BOROVKOVA et al, 2018).

Além disso, essa técnica é não invasiva e totalmente inofensiva para organismos vivos, uma vez que o THz tem cerca de três ordens de magnitude (menos energia do que o necessário para a ionização) que a maioria das fontes de espectroscopia no domínio temporal de THz (HERNANDEZ-CARDOSO et al, 2017). No entanto, não só a água pode causar as diferenças observadas nos índices de refração. Alterações estruturais moleculares potencialmente presentes no tecido doente foram descritas e podem afetar a resposta THz. Por exemplo, o DNA metilado, encontrado precocemente no tecido cancerígeno, pode dar uma ressonância distinta na leitura de THz (SUN et al, 2017). Por essa razão, em biologia e medicina, tais fontes de baixa frequência de THz são amplamente aplicadas para investigações conformacionais, alterações moleculares, reação química e muitas outras aplicações (SHUMYATSKY & ALFANO, 2011).

A tecnologia THz melhorou significativamente nos últimos anos, de forma que a imagem THz se tornou mais acessível e mais fácil de usar, com um crescente interesse em aplicações biomédicas (SUN et al, 2017). Em um estudo experimental, o THz tem sido usado para medir a homocisteína, e tem mostrado maior precisão quando comparado ao espectro *laser-raman* para detecção de concentração, o método de referência para determinar o estágio da doença patológica associado à homocisteína no plasma humano e urina (LI et al, 2018). Além disso, um estudo recente endossou a identificação quantitativa e em tempo real da homocisteína em líquido humano por espectroscopia Terahertz (WANG et al, 2020).

2.1.3 Diagnóstico oncológico

Os biomarcadores de câncer têm desempenhado um papel significativo no fornecimento de informações para diagnósticos específicos. Particularmente, a carcinogênese pode causar produtos químicos e alterações estruturais no DNA celular, e a detecção de tais alterações seria importante para identificar tumores. Vários grupos de pesquisa caracterizaram as propriedades espectrais do DNA na faixa de frequência THz (CHEON et al, 2016). Dessa forma, a regulação da expressão gênica pode estar intimamente relacionada à carcinogênese, razão pela qual, na avaliação do DNA, a metilação pode ser um fator chave na pesquisa do câncer. Como existe uma frequência característica de DNA metilado na região de THz, a radiação THz pode desempenhar um papel importante na atividade de metilação para a terapia do câncer (CHEON et al, 2019).

As ondas THz podem detectar diretamente alterações no DNA metilado porque as energias características estão na mesma região de frequência. Além disso, os níveis de energia THz não são altos o suficiente para danificar o DNA por ionização, como descrito anteriormente (CHEON et al, 2016). Essas propriedades permitem que as ondas THz sejam adequadamente utilizados em imagens biomédicas não invasivas para diagnóstico de câncer (YU et al, 2012; RONG et al, 2015).

A imagem THz foi sugerida para identificação de queimadura de pele e câncer. Estudos demonstraram influência da concentração e distribuição de melanomas e melanina na pele nas propriedades espectroscópicas de THz (PERALTA et al, 2019).

A tecnologia THz tem sido rapidamente desenvolvida e aplicada ao diagnóstico "*label-free*" de doenças malignas com diferentes classificações e locais, ou seja, detecção sem necessidade de qualquer marcador composto ou enzima. Eles fornecem a capacidade de detectar um tumor tecidual em picosegundos, e a profundidade de sondagem nos tecidos está em microns, com resolução espacial em escala inferior a milímetros. Alguns estudos têm demonstrado tal metodologia diagnóstica em cirurgias de glioma, apontando a vantagem potencial do diagnóstico de THz sobre esse tipo de espectroscopia intraoperatória (GAVDUSH et al, 2019). Com base em diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia de Radiação, uma técnica de avaliação de margem eficiente precisa não apenas detectar câncer na borda cirúrgica do tecido, mas também detectar uma largura de margem mais ampla

que pode reduzir significativamente o risco de recidiva. Imagens de potência espectral de THz e imagens tomográficas mostraram uma boa comparação qualitativa com a abordagem patológica. Os resultados foram avaliados com sucesso com imagens patológicas, mostrando forte diferenciação entre tecidos cancerígenos e de saúde para todos os tecidos excisados recentemente (BOWMAN et al, 2019; EL-SHENAWEE et al, 2019).

Devido ao uso de ondas THz na espectrometria intraoperatória, ou seja, diretamente no tecido do paciente, as preocupações com a segurança biológica e potenciais aplicações biológicas vêm crescendo, pois, os efeitos e influências das ondas de THz não foram bem estabelecidos em organismos vivos (TAN et al, 2019). As ondas THz podem ser facilmente absorvidas por moléculas polares, levando ao aquecimento tecidual e à produção de efeitos térmicos perceptíveis (TAN et al, 2019). No entanto, a espectroscopia THz pode apresentar alta sensibilidade a alterações químicas em moléculas biológicas, mesmo sem causar ionização e minimizando consideravelmente esse risco. Nesse cenário, o diagnóstico de câncer por THz vem atraindo alta atenção, especialmente porque a técnica THz pode distinguir o normal de tecidos anormais por imagens espectroscópicas (YU et al, 2012; KISTENEV et al, 2019).

2.1.4 Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico rápido de infecções bacterianas continua sendo um grande desafio para a medicina. Apesar da disponibilidade de antibióticos, as infecções bacterianas têm causado uma mortalidade mundial significativa. A principal causa de mortalidade tem sido considerada a identificação tardia da fonte de infecção, o que leva a tratamento médico inadequado (BERRIER et al, 2012). A maioria das técnicas de detecção de microbianos tem exigido pré-tratamento, como fluorescência e processos culturais. Assim, novas ferramentas para classificação e identificação de microrganismos, como mofo, levedura e bactérias, com base em suas frequências THz, foram desenvolvidas e estabelecidas (YOON et al, 2020).

Os sinais de THz com comprimento de onda de aproximadamente 300 μm (mícron) proporcionam um bom equilíbrio entre penetração, profundidade e resolução espacial em aplicações biológicas, que podem identificar moléculas biológicas como água, CO_2 , glicose, levedura, proteínas, oligonucleotídeos, vírus e bactérias

(BERRIER et al, 2012).

Bactérias envolvidas em infecções podem ser identificadas devido a alterações no teor de água de tecidos infectados (SUN et al, 2017). Além disso, o transporte de carga tem sido um dos fenômenos mais importantes que garantem a função dos sistemas biológicos. Filamentos extracelulares, parte de várias bactérias eletrogênicas, podem ser capazes de transmitir elétrons através de distâncias surpreendentes, e que podem ser identificados por radiação THz (GAGKAEVA et al, 2018).

Ferramentas médicas avançadas para detecção bacteriana facilitariam a tomada de decisão em terapias mais individualizadas, e a espectroscopia de THz mostrou-se recentemente como método potencial de detecção com avanços relacionados à caracterização de componentes bacterianos (BERRIER et al, 2012).

2.1.5 Diagnóstico virológico

Além de não invasivas, as propriedades não ionizantes da radiação THz permitem que a técnica possa ser utilizada como espectroscopia para estruturas ainda mais complexas. Na proteína, particularmente, as informações conformacionais desempenham um papel importante nas interações moleculares que podem ser analisadas por THz.

Como candidato a uma rápida detecção de biomateriais, o sistema de espectroscopia THz pode ser considerado com uma vantagem devido ao seu método de diagnóstico "*label-free*". Como o espectro proteico está na região de leitura do Terahertz, as informações conformais mais importantes nas interações moleculares podem ser capturadas (LEE et al, 2017).

Devido à posição espacial da faixa THz no espectro eletromagnético, as ondas THz são transitórias e têm alta penetração, banda larga, coerência e baixa energia, podendo detectar a maioria das biomoléculas como DNA, RNA e outras proteínas virais (KHALIDUZZAMAN et al 2015).

A detecção e identificação de vírus tem sido de alto interesse devido à sua associação com doenças graves. Nas últimas décadas, várias técnicas de detecção de vírus, incluindo a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e transcrição reversa da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) para identificação de DNA e RNA, respectivamente, foram desenvolvidas e estabelecidas. Apesar de historicamente

muito úteis, essas técnicas têm sido consideradas exigentes e laboriosas, e novas tecnologias podem permitir detecção não invasiva, rápida e sensível (PARK et al, 2017).

O efeito da radiação THz é específico do gene e exposição, e provavelmente, ocorre no nível de transcrição do DNA no RNA. Nesse contexto, por simulação computacional, e algoritmo de modelagem, mostrou-se que a propensão do promotor de DNA, no momento da transcrição, é provavelmente um dos fatores subjacentes para a resposta genética específica às condições de irradiação aplicada (BOCK et al, 2010).

A possibilidade de detecção de vírus por THz foi demonstrada para agentes causadores da Influenza H1N1, H5N2 e H9N2, utilizando uma configuração experimental do equipamento. Outra possibilidade é a detecção do vírus Zika por espectroscopia de THz, utilizando também configuração experimental de equipamentos. Espectroscopia de reflexo THz pode ser usada para detectar vírus ou aptâmeros projetados para atingir as proteínas do capsídeo. Os aptâmeros são oligonucleotídeos projetados e direcionados para se ligar a uma molécula específica, tecido, biomarcador ou patógeno (DOLAI & TABIB-AZAR, 2020; KESHAVARZ & VAFAPOUR, 2019).

O vírus da gripe tem sido caracterizado por dois tipos de antígenos de superfície transportados, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), como H1N1, H5N2 e H9N2. Ha é a principal glicoproteína superficial do vírus influenza A, que do subtipo H9N2 tem sido reconhecida como a cepa pandemia mais provável, cruzando a barreira das espécies hospedeiras e infectando suínos e seres humanos. A espectroscopia THz tem sido aplicada para avaliar a formação de camada de hidratação em torno da proteína HA do vírus (SUN et al, 2015).

Apesar dos relatos acima, poucos estudos de THz até o momento abordaram o diagnóstico do vírus. A detecção desses microrganismos pode ser um desafio porque suas frequências e ondas são menores que o comprimento de onda THz. No entanto, por algoritmos de modelagem e metamateriais capazes de manipular ondas eletromagnéticas, estudos adicionais podem ser promissores (PARK et al, 2017).

2.1.6 Aplicação potencial no diagnóstico SARS-CoV-2

Além das outras aplicações aqui descritas, existe a possibilidade de aplicar a metodologia diagnóstica THz, incluindo seu uso em momentos de crise mundial como as pandemias atuais. O Covid-19 pode enfatizar a importância do uso cuidadoso dos recursos financeiros e humanos, o que pode ser particularmente crucial na Saúde Pública. Uma boa organização e abordagem preventiva devem ser obrigatórias (COCCOLINI et al, 2020; LI et al, 2020).

Os casos iniciais do Covid-19 ocorreram em Wuhan, província de Hubei, China, entre dezembro de 2019 e janeiro de 2020. A Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou em 31 de janeiro o surto de Covid-19 na China como uma emergência de saúde pública de interesse internacional, que foi caracterizada como pandemia em 11 de março. O vírus causal de Covid-19, SARS-CoV-2, foi isolado em janeiro de 2020 e identificado como membro de β -CoVs (LI et al, 2020, CHANG et al, 2020). Os EUA classificaram a pandemia como emergência nacional em 14 de março de 2020. O vírus que se espalhou rapidamente na China e na Itália superou rapidamente a capacidade de internação. Devido à incerteza sobre o número de pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2, principalmente assintomáticas, é difícil avaliar a precisão das projeções geradas por modelos epidemiológicos complexos (LI et al, 2020).

No Brasil, os casos aumentam diariamente e o estado mais afetado foi São Paulo, também o mais populoso. Até 14 de abril de 2020, a taxa de mortalidade era de 1.361/23.955 (5,68%) (MARSON & ORTEGA, 2020).

Os casos Covid-19 não diagnosticados têm sido uma preocupação em meio à pandemia e à falta de suprimentos em quantidade e qualidade para o RT-qPCR. Em certos momentos, devido à escassez de produtos, a pandemia só poderia ser monitorada pelo aumento de casos de pneumonia nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em hospitais de referência das cidades afetadas (CIMERMAN et al, 2020). O isolamento dos casos e o acompanhamento de contatos recentes, que tem sido utilizado para controlar surtos de doenças infecciosas há séculos, também foi utilizado nas pandemias Covid-19. A transmissão prévia ao início dos sintomas só poderia ser evitada pelo monitoramento de contatos prévios de casos confirmados por meio de exames diagnósticos. Pessoas infectadas sem atendimento hospitalar, provavelmente devido a infecção subclínica, tem sido o maior desafio da propagação do Covid-19 praticamente imparável (HELLEWELL et al, 2020)

Estudos sugerem que a maioria dos pacientes pode desenvolver anticorpos apenas na segunda semana após o início clínico inicial. Assim, o diagnóstico Covid-19 baseado na detecção de anticorpos pela sorologia só pode ser possível em fase de recuperação clínica, às vezes sendo tarde para intervenção clínica precoce ou interrupção da transmissão. Neste ponto, com base nos dados disponíveis até o momento, a OMS não recomendou a utilização de testes sorológicos rápidos na prática clínica, e incentiva o trabalho contínuo para identificar sua utilidade nos estudos de vigilância epidemiológica (DIAS et al, 2020).

Um teste de diagnóstico de alta precisão para infecção por SARS-CoV-2 foi necessário para orientar uma ação rápida para o isolamento automático e tratamento clínico precoce. Os testes também orientariam a tomada de decisão sobre o rastreamento recente de contatos, terapias para Covid-19 ou tratamento alternativo para resultados negativos, e monitoramento do impacto de tais intervenções na saúde pública e resultados direcionamentos de pesquisas, como a eficácia de medicamentos (OMS, 2020).

O Covid-19 tem tratado a população geral, apesar dos casos assintomáticos, devido a complicações da doença e morte em alguns pacientes. A pneumonia associada ao ventilador (PAV) tem sido uma infecção nosocomial que ocorre na unidade de terapia intensiva e seu padrão diagnóstico tem sido baseado em critérios clínicos e lavagem broncoalveolar. A análise do ar exalado tem sido um método promissor não invasivo para o diagnóstico rápido de tais pneumonias, que compreendem teores orgânicos voláteis exógenos e endógenos (VOCs) que podem diferenciar os doentes dos indivíduos de saúde. Os VOCs capturados em tubos de adsorção podem ser medidos por cromatografia a gás e espectrometria de massa (ROTHBART et al, 2019; VAN-OORT et al, 2017)

Como os sintomas e sinais do Covid-19 têm sido semelhantes a várias outras doenças febris e respiratórias comuns, a vigilância e o manejo dos pacientes dependem de testes diagnósticos precisos (OMS, 2020). A análise das ondas THz poderia ser utilizada em medições de VOC em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, uma vez que a técnica já foi utilizada em outras aplicações médicas e diagnósticos, conforme descrito acima. A respiração poderia ser amostrada de forma fácil e rápida com a frequência necessária, com uma possível medição, como indicado anteriormente (ROTHBART et al, 2019). Na ausência de possíveis intervenções bem-sucedidas, uma métrica fundamental para o sucesso do

distanciamento social seria melhor para uma vigilância epidemiológica eficaz (KISSLER et al, 2020).

2.2 CONCLUSÃO

Neste trabalho de revisão, os avanços mais recentes na pesquisa sobre tecnologia THz e suas aplicações foram brevemente apresentados, com foco em novos estudos relacionados ao diagnóstico. Há um grande esforço da comunidade científica internacional para explorar melhor as potencialidades da tecnologia THz, gerando inovações e práticas de aplicações. O futuro promissor da tecnologia THz envolve grandes desafios, mas o potencial para gerar conhecimento, novos produtos e aplicações é igualmente grande. Além disso, a introdução da tecnologia THz como plataforma de diagnóstico em institutos de pesquisa pode proporcionar resultados viáveis e rápidos para tratamentos de saúde pública, como diagnóstico de doenças raras, câncer, bactérias resistentes a antibióticos e muitos outros. Finalmente, os Institutos de Pesquisa devem estabelecer a espectrometria THz como plataformas tecnológicas para o desenvolvimento de soluções de emergência, fornecendo soluções que seriam cruciais em situações pandêmicas.

REFERÊNCIAS

- BERRIER A, SCHAAFSMA MC, NONGLATON G, et al, Selective detection of bacterial layers with terahertz plasmonic antennas, **Biomed Opt Express**;3(11):2937–49, 2012.
- BOCK J, FUKUYO Y, KANG S, et al. Mammalian stem cells reprogramming in response to terahertz radiation, **PLoS One**;5(12):8–13, 2010.
- BOROVKOVA M, KHODZITSKY M, DEMCHENKO P, et al, Terahertz time-domain spectroscopy for non-invasive assessment of water content in biological samples, **Biomed Opt Express**;9(5):2266, 2018.
- BOWMAN T, BAILEY K, EL-SHENAWEE M, et al., Terahertz tomographic imaging of freshly excised human breast tissues, **J Med Imaging**;6(02):1, 2019.
- BROWNE M, YARDIMCI NT, SCOFFONI C, et al, Prediction of leaf water potential and relative water content using terahertz radiation spectroscopy, **Plant direct**. 17;4(4):e00197–e00197, 2020.

CHANG L, YAN Y, WANG L, Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety, **Transfus Med Rev**;34(2):75–80, 2020.

CHEON H, YANG HJ, LEE SH, et al, Terahertz molecular resonance of cancer DNA, **Sci Rep**;6(August):1–10, 2016.

CHEON H, PAIK JH, CHOI M, et al, Detection and manipulation of methylation in blood cancer DNA using terahertz radiation, **Sci Rep**;9(1):1–10, 2019.

CHEVALIER P, AMIRZHAN A, WANG F, et al., Widely tunable compact terahertz gas lasers, **Science** (80-) 15;366(6467):856, 2019.

CIMERMAN S, CHEBABO A, CUNHA CA, et al, Deep impact of COVID-19 in the healthcare of Latin America: the case of Brazil, **Braz. J. Infect. Dis**;24(2):93–5, 2020.

COCCOLINI F, PERRONE G, CHIARUGI M, et al., Surgery in COVID-19 patients: Operational directives, **World J Emerg Surg**;15(1):1–7, 2020.

DABOUI V, CHANCERELLE Y, CROUZIER D, et al, À la frontière onde-lumière Que peuvent apporter les techniques térahertz (THz) dans le domaine de la santé ?, **Medicine Sciences**, ; 25 : 739-43, 2009.

DOLAI S, TABIB-AZAR M, Terahertz Detection of Zika Viruses, **Research Gate**, 2020.

EL NAHRAWY AM, HAMMAD ABA, BAKR AM, et al, Decontamination of ubiquitous harmful microbial lineages in water using an innovative Zn₂Ti_{0.8}Fe_{0.2}O₄ nanostructure: dielectric and terahertz properties, **Heliyon** ;5(9), 2019.

EL-SHENAWEE M, VOHNA N, BOWMAN T, et al, Cancer detection in excised breast tumors using terahertz imaging and spectroscopy, **Biomed Spectrosc Imaging** ;8(1-2):1-9, 2019.

FENG S-J, DONG L-Q, MA D, et al., Excitation-wavelength-dependent THz wave modulation via external bias electric field. Chinese, **Phys B**. Mar 31;29, 2020.

GAGKAEVA Z V., ZHUKOVA ES, GRINENKO V, et al., Terahertz-infrared spectroscopy of *Shewanella oneidensis* MR-1 extracellular matrix, **J Biol Phys**.;44(3):401–17, 2018.

GAVDUSH AA, CHERNOMYRDIN NV, MALAKHOV KM, et al., Terahertz spectroscopy of gelatin-embedded human brain gliomas of different grades: a road toward intraoperative THz diagnosis, **J Biomed Opt**;24(02):1, 2019.

HELLEWELL J, ABBOTT S, GIMMA A, et al., Feasibility of controlling COVID-19 outbreaks by isolation of cases and contacts, **Lancet Glob Heal**;8(4):e488–96, 2020.

HERNANDEZ-CARDOSO GG, ROJAS-LANDEROS SC, ALFARO-GOMEZ M, et al., Terahertz imaging for early screening of diabetic foot syndrome: A proof of concept, **Sci Rep**;7:1–9, 2017.

HUANG L, LI C, LI B, et al, Studies on qualitative and quantitative detection of trehalose purity by terahertz spectroscopy, **Food Sci Nutr**;8(4):1828–36, 2020.

KESHAVERZ A, VAFAPOUR Z, Sensing avian influenza viruses using terahertz metamaterial reflector, **IEEE Sens J**;19(13):5161–6, 2019.

KHALIDUZZAMAN A, KONAGAYA K, SUZUKI T, et al, A Nondestructive Eggshell Thickness Measurement Technique Using Terahertz Waves, **Sci Rep**;10(1):1–5, 2020.

KISLER SM, TEDIJANTO C, GOLDSTEIN E, et al, Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic, **period. Science** ;368(6493):860, 2020.

KISTENEV Y V., BORISOV A V., TITARENKO MA, et al, Diagnosis of oral lichen planus from analysis of saliva samples using terahertz time-domain spectroscopy and chemometrics, **J Biomed Opt**;23(04):1, 2018.

LEE DK, KANG JH, KWON J, et al., Nano metamaterials for ultrasensitive Terahertz biosensing, **Sci Rep**;7(1):5–10, 2017.

LI Q, GUAN X, WU P, et al., Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia, **N Engl J Med**;382(13):1199–207, 2020.

LI T, MA H, PENG Y, et al., Gaussian numerical analysis and terahertz spectroscopic measurement of homocysteine, **Biomed Opt Express**;9(11):5467–76, 2018.

MARSON FAL, ORTEGA MM, COVID-19 in Brazil, **Pulmonology**;26(4):241–4, 2020.

PARK SJ, CHA SH, SHIN GA, et al, Sensing viruses using terahertz nano-gap metamaterials, **Biomed Opt Express**;8(8):3551, 2017.

PERALTA XG, LIPSCOMB D, WILMINK GJ, et al, Terahertz spectroscopy of human skin tissue models with different melanin content, **Biomed Opt Express**;10(6):2942, 2019.

RONG L, LATYCHEVSKAIA T, CHEN C, et al., Terahertz in-line digital holography of human hepatocellular carcinoma tissue, **Sci Rep** ;5:1–6, 2015.

ROTHBART N, HOLZ O, KOCZULLA R, et al, Analysis of human breath by millimeter-wave/terahertz spectroscopy, **Sensors**;19(12):1–12, 2019.

SHAO Y, GU W, QIU YA, et al., Lipids monitoring in *Scenedesmus obliquus* based on terahertz technology, **Biotechnol Biofuels**;13(1):1–11, 2020.

SHUMYATSKY P, ALFANO RR, Terahertz sources, **J Biomed Opt.**;16(3), 2011.

SIRTORI C, Applied physics: Bridge for the terahertz gap, **Nature**;417(6885):132–3, 2002.

SUN Q, HE Y, LIU K, et al, Recent advances in terahertz technology for biomedical applications, **Quant Imaging Med Surg**;7(3):345–55, 2017.

SUN Y, ZHONG J, ZHANG C, et al, Label-free detection and characterization of the binding of hemagglutinin protein and broadly neutralizing monoclonal antibodies using terahertz spectroscopy, **J Biomed Opt**;20(3), 2015.

TAN SZ, TAN PC, LUO LQ, et al., Exposure Effects of Terahertz Waves on Primary Neurons and Neuron-like Cells Under Nonthermal Conditions, **Biomed Environ Sci**;32(10):739–54, 2019.

VAN-OORT PMP, NIJSEN T, WEDA H, et al., BreathDx - molecular analysis of exhaled breath as a diagnostic test for ventilator-associated pneumonia: Protocol for a European multicentre observational study, **BMC Pulm Me**;17(1):1–8, 2017.

VIEIRA FS, CRUZ FC, PLUSQUELLIC DF, et al, Tunable resolution terahertz dual frequency comb spectrometer, **Opt Express**; 24(26):30100–7, 2016.

XIE L, YAO Y, YING Y, The application of terahertz spectroscopy to protein detection: A review, **Appl Spectrosc Rev**;49(6):448–61, 2014.

XU Y, ZHANG F, ZHANG XQ, et al., Research advances in spintronic terahertz sources, **Acta Phys Sin**;69(20), 2020.

WANG L, WU X, PENG Y, et al., Quantitative analysis of homocysteine in liquid by terahertz spectroscopy, **Biomed Opt Express**;11(5):2570–7, 2020.

WEI C, ZHANG Y, LI R, et al., Terahertz irradiation-induced motility enhancement and intracellular calcium elevation in human sperm in vitro, **Biomed Opt**

Express;9(9):3998, 2018.

WORD HEALTH ORGANIZATION, , [Internet]. [cited 2020 Dec 6]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>, 2020.

YOON SA, CHA SH, JUN SW, et al., Identifying different types of microorganisms with terahertz spectroscopy, **Biomed Opt Express**;11(1):406, 2020.

YU C, FAN S, SUN Y, et al, The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis: A review of investigations to date, **Quant Imaging Med Surg**;2(1):33–45, 2012.

ZHANG J, YANG Y, FENG X, et al, Identification of Bacterial Blight Resistant Rice Seeds Using Terahertz Imaging and Hyperspectral Imaging Combined With Convolutional Neural Network, **Front Plant Sci**;11:821, 2020.

3 TESTE DE ANÁLISE DA RESPIRAÇÃO (TERA. BIO®) PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2 POR ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS BASEADOS NA TECNOLOGIA TERAHERTZ (artigo aceito para publicação)

3.1 INTRODUÇÃO

A atual pandemia Covid-19, causada pelo vírus respiratório SARS-CoV-2, demonstrou a importância do uso rápido e focado de recursos financeiros e humanos (BAKER et al, 2021). Os sistemas de saúde em todo o mundo têm sido continuamente desafiados base para a tomada de decisões sobre distanciamento social, autoisolamento, toque de recolher, bloqueio e outras medidas preventivas para a disseminação e mortalidade do vírus (COCCOLINI et al, 2020; LI et al, 2020). Um teste confiável, rápido, não invasivo e no local, particularmente detectando pessoas assintomáticas, poderia ser usado para evitar tais medidas de perda, permitindo o trabalho ininterrupto de empresas comerciais e serviços públicos (MATRAJT et al, 2021; FORNI et al, 2021; CIMERMAN et al, 2020; HELLEWELL et al, 2020).

O SARS-CoV-2 resultou em uma pandemia contínua até o momento, principalmente devido à transmissão rápida entre pessoas de contato próximo (LEUNG et al, 2020), começando 2-3 dias antes do início dos sintomas (HUFF & SINGH, 2020), com transmissão respiratória dominante (MEYEROWITZ et al, 2020). Apesar da transcrição reversa quantitativa da reação em cadeia de polimerase (RT-qPCR), usada principalmente em amostras invasivas de *swab* nasofaríngeo, ser considerada como método de diagnóstico padrão-ouro para SARS-CoV-2, a taxa falsa-negativa variou amplamente nos primeiros 5 dias (até 67%) de exposição, e no 8 dia após a exposição (21%) (KUCIRKA et al, 2020). Os pacientes assintomáticos para SARS-CoV-2 podem permanecer espalhados, desconhecidos em suas comunidades, variando entre 5% e 80% das pessoas pesquisadas (CEBM, 2020).

Assim, o diagnóstico confiável tem sido crucial para a rápida detecção do SARS-CoV-2, interrupção da transmissão e compreensão epidemiológica (OMS, 2020).

Além de amostras de *swab*, escarro e ar exalado têm sido supostamente utilizados em diagnóstico médico devido à dispersão de ar de compostos orgânicos voláteis (VOC) como resultado do metabolismo do paciente doente (MUTLU et al,

2001). Considerando a invasividade dos testes aéreos expirados, tal amostragem pode potencialmente se tornar um método de diagnóstico muito conveniente. Além disso, o teste de análise da respiração (BAT) pode ser amostrado mais rápido, quando comparado com as amostras de nasofaringe, permitindo maior amostragem, análise e detecção no local (HAO et al, 2019).

A radiação Terahertz (THz) tem sido descrita como ondas eletromagnéticas não ionizantes seguras para humanos, localizadas no espectro eletromagnético entre ondas micro e infravermelhas (PENG et al, 2020; PENG et al, 2020; VOHNA et al, 2020; BISWAS et al, 2020). A tecnologia emergente baseada em THz tem sido demonstrada para detectar bio-impressões digitais como vírus, infecções bacterianas, material orgânico e inorgânico em líquidos e fases gasosas, bem como VOC do ar exalado (SHUMYATSKY & ALFANO, 2011; DABOUIIS et al, 2009; SUN et al, 2017).

Um novo teste de análise do bafômetro comercialmente disponível (TERA. Bio®, TeraGroup Terahertz LTD - Herzliya, Israel) também pode ser capaz de identificar a presença de VOC em amostras de ar exalado de indivíduos infectados por SARS-CoV-2, quando associados a um sistema de algoritmo especial. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade de um teste de análise da respiração comercial (TERA). Bio®) na detecção da presença da infecção por SARS-CoV-2, quando comparada ao RT-qPCR, em pacientes sintomáticos e assintomáticos do Sul do Brasil, Paraná.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Descrição do método

Equipamento

Uma estação eletrônica portátil, chamada "BioStation", ®, foi aplicada para analisar os biomateriais de aerossóis respiratórios coletados em seus "Teratubes". O BioStation, um dispositivo com tecnologia embarcada e integrada, é composto pelo software "Terasystem", uma plataforma de diagnóstico tecnológico Terahertz, e pelo scanner "TeraScanner", que analisa as assinaturas espectrais de biomateriais, compostos orgânicos voláteis (VOCs), usando o sistema de espectroscopia.

O algoritmo, baseado nos dados coletados durante a validação *in vitro* e estudos clínicos, identifica a área de espectro onde VOCs, proteínas e biomarcadores associados ao SARS-CoV-2 foram localizados. Utilizando recursos adicionais de varreduras da respiração repetidas, com base no modelo estatístico de aprendizagem de máquina realizado em estudos anteriores, o sistema se torna capaz de diferenciar entre as amostras “claras” e as de respiração “não claras”, e o algoritmo é definido (determinístico).

O software usado pelo BioStation é chamado BioPass, com interface do Windows 10. O Teratube, um acessório da BioStation, é usado para coletar e reter amostras de ar exaladas. Os Teratubes são compostos de tubo portátil e descartável à base de polipropileno e membrana à base de espuma de melamina descartável, feita para uso único e que deve ser descartada como risco biológico após o uso e análise.

Informações adicionais (protegidas por Acordo de Confidencialidade) relacionadas ao método diagnóstico e ao funcionamento do equipamento estarão na publicação do artigo.

Casos clínicos

Foi realizada validação utilizando-se amostras clínicas projetada como um estudo transversal não controlado e prospectivo, com braço único, para analisar este teste comercial do teste de análise da respiração (BAT) para o diagnóstico SARS-CoV-2, utilizando o RT-qPCR como o método padrão-ouro para avaliar a sensibilidade e a especificidade do teste. Os resultados da RT-qPCR utilizados neste trabalho foram obtidos no Laboratório de Referência do Estado do Paraná, durante a análise de rotina. O protocolo aqui estabelecido foi submetido e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa Clínica - CONEP (número do parecer: 4.234.085).

Indivíduos sintomáticos e assintomáticos de Curitiba e região metropolitana foram selecionados aleatoriamente e avaliados na unidade de referência do Hospital Oswaldo Cruz, de 9 a 22 de setembro de 2020. Os critérios de inclusão foram casos ambulatoriais, maiores de 18 anos, assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), amostragem no mesmo dia para testes de RT-qPCR e BAT para SARS-CoV-2. Os critérios de exclusão foram participantes menores de 18 anos, casos hospitalizados, participantes cujos testes de BAT para SARS-CoV-2 não

foram realizados concomitantemente, participantes cujas análises de teste de BAT para SARS-CoV-2 foram realizadas mais de seis horas após a amostragem, e participantes sem TCLE assinado por qualquer motivo.

A suposta positividade da RT-qPCR para o cálculo amostral no momento da submissão do projeto foi de 25%, e foi avaliado que com a inclusão de no mínimo 100 participantes positivos em um total estimado de no mínimo 400 participantes no estudo, podendo chegar até 3000 caso necessário, seria o suficiente. Foi utilizada uma amostragem de conveniência e os dados clínicos, epidemiológicos e sociodemográficos de todos os sujeitos incluídos no estudo foram obtidos por formulário aplicado aos participantes apresentados nos resultados.

Cada participante foi amostrado soprando cinco vezes em um Teratube descartável, que reteve ar exalado para posterior detecção da presença SARS-CoV-2 relacionada ao padrão VOC. Teratube e amostra de *swab* nasofaríngeo foram identificados para rastreabilidade e as amostras foram posteriormente testadas por características espectrais na banda THz.

Procedimento de teste RT-qPCR

A secreção nasofaríngea dos participantes foi obtida por um *swab rayon* e armazenada em mídias de transporte viral (Produtos do Laboratório Laborclin, Pinhais, Brasil) e refrigeradas no Laboratório de Referência do Estado do Paraná até o teste, seguindo protocolos padrão previamente estabelecidos (OMS, 2020). A co-infecção por outros vírus também foi investigada usando os mesmos protocolos descritos acima, incluindo Influenza A, Influenza B, Coronavírus Humano 229E, Coronavírus Humano NL63, Coronavirus Humano HKU1, Coronavirus Humano OC43, Adenovirus, Vírus Sincicial Respiratório, Metapneumovírus, Rhinovirus, Bocavirus, Enterovirus, Parainfluenza Tipo 1, Parainfluenza tipo 2 e Parainfluenza tipo 3. A detecção do SARS-CoV-2 foi realizada por meio de *kit* molecular comercialmente disponível (BIOMOL One-step/COVID19, Molecular Biology Institute of Paraná – IBMP, Curitiba, Brasil), de acordo com o protocolo do fabricante (IBMP, 2020).

Apesar dos resultados do RT-qPCR terem sido incluídos no Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) e posteriormente entregues aos participantes pela equipe de atenção básica, os resultados não estavam disponíveis para a equipe do TeraGroup até o final da análise, garantindo a confiabilidade dos resultados.

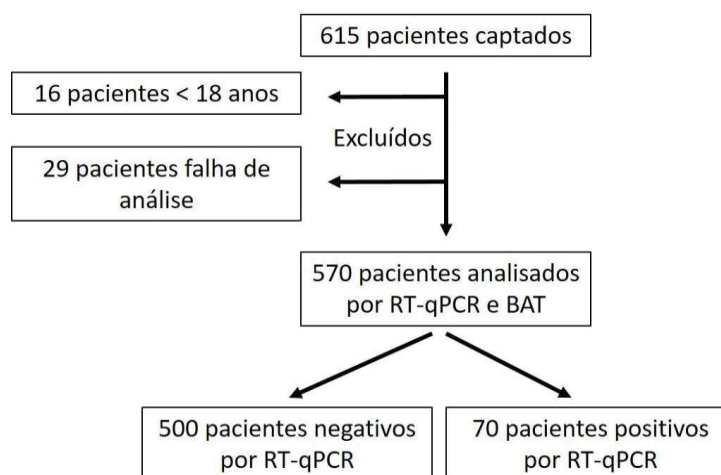
Análise estatística

As características sociodemográficas, epidemiológicas e clínicas foram apresentadas em percentual, acompanhadas do Intervalo de Confiança (IC) de 95%); ou média aritmética com desvio padrão. Os resultados foram apresentados em tabelas de contingência, permitindo o cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos. A avaliação da associação entre os resultados dos testes de BAT e RT-qPCR foi realizada pelo teste exato de Fisher. A precisão do método foi calculada pela análise das curvas ROC. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS versão 17.

Seleção de participantes e características da população estudada

O fluxograma de leitura do participante para a validação do teste BAT SARS-CoV-2 é demonstrado na Figura 2.

Figure 1 - Fluxograma de seleção de participantes para a etapa de validação do BAT



3.3 RESULTADOS

Apesar de 615 participantes terem sido inicialmente incluídos, apenas 570 permaneceram no estudo. Assim, foram excluídos 45/615 (7,3%) casos, incluindo 16 menores de idade e 10 participantes com falta de informação e/ou rastreabilidade. Além disso, os resultados amostrais de 19/615 (3,08%) foram descartados devido a

falhas no teste que exigiria um reteste do BAT ou uso de outros métodos diagnósticos SARS-CoV-2.

Os resultados do formulário para avaliação dos dados clínicos, epidemiológicos e sociodemográficos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Dados sociodemográficos, epidemiológicos e clínicos dos sujeitos incluídos na pesquisa

Características*	Casos confirmados (n=70)		Casos não confirmados(n=500)	
	% Respondido [†]	No. (%) ou média (SD) ^a	%Respondido [†]	No. (%) ou média (SD) ^a
<i>Dados demográficos</i>				
Idade (anos)	100%	38,6 ±11,1	100%	37,1±12,5
Sexo masculino	100%	41 (58 %)	100%	233 (46,6%)
Índice de Massa Corporal(kg/m ²)	98,7%	27,6 ± 4,7 ^b	95,8%	25,9 ± 4,5
Raça não-branca	88,5%	25 (40,3%) ^b	92,2%	71 (15,4%)
<i>Dados epidemiológicos</i>				
Histórico de viagem	100%	07 (10%)	96,8%	81 (16,7%)
Contato com caso suspeito	100%	35 (50%))	96,8%	218 (43,6%)
Contato com caso confirmado	100%	32 (45,7%) ^b	97%	156 (31,2%)
Frequentou serviço de saúde	100%	20 (28,6)	96,8%	185 (38,2%)
<i>Apresentação clínica</i>				
Sintomáticos	100%	66 (94,3%) ^b	100%	338 67,6%)
Dias com sintomas (dos casos sintomáticos) ^c	75,7%	5,4 ± 2,6	36,4%	5,1 ± 3,4
Febre ou Calafrios	100%	55 (78,6 %) ^b	100%	93 (18,6%)
Mialgia ou Artralgia	100%	63 (90,0%) ^b	100%	129 (25,8%)
Cefaléia	100%	44 (62,9%) ^b	97%	218 (44,9%)
Sintomas Respiratórios (tosse, odinofagia, dispneia, coriza)	100%	65 (92,9%) ^b	100%	261 (52,2%)
Sintomas Gastrointestinais (vômito, diarreia)	100%	38 (54,3%) ^b	100%	71 (14,2%)
Anosmia	100%	34 (48,6%) ^b	96,8%	42 (8,7%)
Ageusia	100%	35 (50,0%) ^b	97%	37 (7,6%)
Exantema	94,2%	4 (6,1%)	97,6%	12 (2,5%)
<i>Fatores de risco</i>				
Tabagismo	100%	4 (5,7%)	100%	67 (13,4%) ^b
Pneumopatias	100%	7 (10%)	100%	43 (8,6%)
Diabetes	100%	3 (4,3%)	100%	12,0 (2,4%)
Hipertensão	100%	5 (7,1%)	100%	43 (8,6%)
Outras comorbidades	100%	2 (2,9%) ^b	100%	04 (0,8%)

[†] Informações autorreferidas; * Número de respostas; ^a variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto e frequência e variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio padrão; ^b P<0.05; ^c a data do início dos sintomas não foi relatada.

Desempenho analítico do teste BAT para SARS-CoV-2

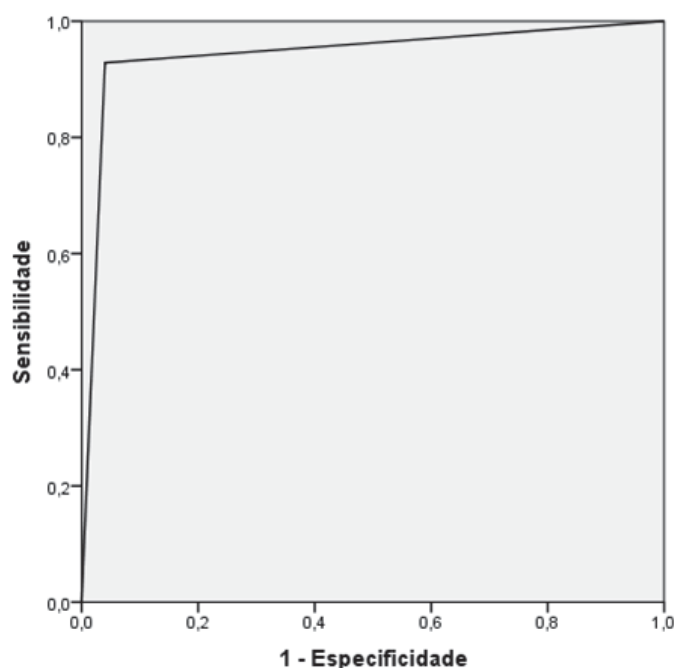
Os resultados do teste de diagnóstico de SARS-CoV-2, considerando a amostragem total, foram apresentados (Tabela 3). Em comparação com o método RT-qPCR como padrão-ouro, foram encontradas 92,86% de sensibilidade (IC 84.11-97,64%) e especificidade de 96,00% (IC 93,89-97,54%) para o método BAT comercial. Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VNPV) foram determinados em 76,47% (IC 66,3-85,00%) e 98,97% (IC 97,61-99,66%), respectivamente. O teste exato de Fisher mostrou associação estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($P < 0.0001$).

Table 3 - Resultados de RT-qPCR e BAT da amostra total

		Resultado RT-qPCR		
		Positivo	Negativo	TOTAL
Resultado BAT	Positivo	65	20	85
	Negativo	5	480	485
	TOTAL	70	500	570

A área sob a curva ROC da amostra total (Figura 4) foi de 0,94 (erro padrão 0,19; CI 0,91-0,98).

Figure 2 - A área sob a curva ROC da amostra total



Ao considerar apenas o participante sintomático e o RT-qPCR como padrão-ouro, o teste BAT mostrou 92,42% de sensibilidade (IC 83,20-97,49%) e 95,86% de especificidade (IC 93,15-97,72%). O PPV determinado foi de 81,33% (IC 70,67-89,40%) e a VPN foi de 98,48% (IC 96,49-99,50%). O teste exato de Fisher mostrou associação estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($P < 0,0001$). A área sob a curva ROC calculada apenas com participantes sintomáticos foi de 0,94 (erro padrão 0,20; IC 0,90-0,98). Considerando que a janela de amostragem ideal de oportunidade para RT-qPCR teria ocorrido durante os primeiros sete dias com sintomas, os dados foram estratificados para análise apenas de participantes sintomáticos, com sete ou menos dias com sintomas.

Os resultados do teste SARS-CoV-2 BAT, utilizando o método RT-qPCR como padrão-ouro, mostraram 90,24% (IC 76-97,28%) sensibilidade e 95,48% (IC 90,92-98,17%) especificidade. O PPV determinado 84,09% (IC 69,93-93,36%) e o VPP foi de 97,37% (IC 93,40-99,28%). Mais uma vez, o teste exato de Fisher mostrou uma associação estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($P < 0,0001$). A área sob a curva ROC calculada apenas para participantes sintomáticos com sete ou menos dias com sintomas foi de 0,93 (erro padrão 0,03; IC 0,87-0,98). Considerando-se apenas participantes assintomáticos,

de 100,00% (IC 39,76-100,00%) sensibilidade e 96,30% (IC 92,11- 98,63%) especificidade foram encontradas, com VPP de 40,00% (IC 12,16-73,76%) e VDV de 100,00% (IC 97,66-100,00%). O teste exato de Fisher mostrou associação estatisticamente significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos ($P < 0,0001$). A área sob a curva ROC calculada apenas com participantes assintomáticos foi de 0,98 (erro padrão 0,01; IC 0,96-1,00). Como limitações do método, uma taxa falsa positiva de 23,5%, de modo que o valor preditivo positivo do teste pode ser comprometido nesta amostra.

Deteção de outros vírus respiratórios

As amostras de *swab* coletadas para detecção de RT-qPCR de SARS-CoV-2 também foram testadas concomitantemente para um painel viral de outros 15 vírus respiratórios. Dos participantes testados, 32/570 (5,61%) apresentaram infecção com os seguintes vírus respiratórios que foram identificados por RT-qPCR: Adenovírus ($n = 1$; 0,2%), Bocavirus ($n = 2$; 0,4%), outros Coronavírus ($n = 6$; 1,1%) e rinovírus ($n = 23$; 4,0%). Foi detectado um único caso de co-deteção, com identificação simultânea de Rhinovirus e outro Coronavírus. Desses participantes, os sintomáticos ($n = 25$; 71,4%) apresentaram principalmente sintomas respiratórios ($n = 22$; 88,0%), mialgia e/ou letargia ($n = 14$; 56,0%), febre e/ou calafrios ($n = 13$; 52,0%) e sintomas gastrointestinais ($n = 10$; 40,0%).

3.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora muito eficiente em condições otimizadas e considerado o método molecular padrão-ouro para SARS-CoV-2, o RT-qPCR pode exigir instrumentos sofisticados e pessoal qualificado (XAVIER et al, 2020). As amostras biológicas devem ser transportadas para laboratórios de referência, aumentando custos e tempo até o processamento e os resultados (PALAZ et al, 2021), com relatos de resultados falsos negativos ou incertos (FENG et al, 2020). Além disso, alternativas de amostragem não invasivas viáveis podem ser desejáveis para substituir cotonetes de orofaringe e nasofaringe (OMS, 2020). Embora a saliva já tenha sido relatada como amostra alternativa para detecção de vírus, o diagnóstico depende do estágio de infecção do participante, apresentando uma janela mais estreita quando comparada à metodologia anterior (PALAZ et al, 2021; FENG et al, 2020;

ALIZARGAR et al, 2020; MEI et al, 2020; NAGURA-IKEDA et al, 2020). Apesar de várias plataformas terem sido relatadas até o momento, poucos estudos mostraram possíveis métodos substitutos ou adicionais para substituição de RT-qPCR (KEVADIYA et al, 2021; JAMES & ALAWNEH, 2020).

Os resultados aqui indicaram 94,4% (IC95%: 91 a 98%) de precisão (acurácia) para participantes sintomáticos e assintomáticos, corroborando com as recomendações da Organização Mundial da Saúde - OMS e mostrando desempenho superior, por exemplo, com a Tomografia Computadorizada (TC) utilizada no estudo de MEI et al, 2020, que também associou algoritmo especial no seu diagnóstico. Demonstrou-se um teste rápido a ser realizado no local e fácil de aplicar, com sensibilidade e especificidade superiores em relação aos testes sorológicos (OMS, 2020; FENG et al, 2020; DIAS et al, 2020) e outros métodos utilizando saliva (NAGURA-IKEDA et al, 2020) e amostras de escarro (YANG et al, 2020).

Apesar do baixo percentual, a presença de outros vírus respiratórios não induziu resultados falso-positivos, sugerindo que a co-infecção de outros vírus respiratórios pode não comprometer a precisão do método. Um estudo anterior na Califórnia, EUA, também não mostrou correlação entre diagnóstico positivo de Covid-19 e infecções respiratórias causadas pelo vírus da Influenza (ZWALD et al, 2020).

Devido aos altos custos dos testes em massa, o uso racional de ferramentas laboratoriais tornou-se crucial para um diagnóstico eficiente (XAVIER et al, 2020; KISSLER et al, 2020). Testes altamente específicos, rápidos e fáceis de aplicar, capazes de identificar a maioria dos participantes em estágios iniciais da infecção pelo SARS-CoV-2, permitindo prontamente o isolamento do participante e outras medidas preventivas de transmissão e disseminação do vírus, reduziriam a infecção e os testes adicionais (OMS, 2020).

Como limitações, a seleção de casos sintomáticos (n = 404; 70,9%) pode ter comprometido parcialmente a avaliação da aplicação potencial de BAT para participantes assintomáticos que apresentaram resultados positivos. Este parâmetro deve ser melhor avaliado com o aumento das amostras de participantes assintomáticos. Importante mencionar que a amplitude de IC 95% de PPV foi a mais ampla de todos os parâmetros analisados de desempenho analítico. No geral, uma investigação mais aprofundada deve ser conduzida para estabelecer plenamente o

desempenho do BAT em grupos assintomáticos, em participantes menores de 18 anos e em participantes nos primeiros dias de infecção, bem como após 7 dias de início da doença. Finalmente, aumentar o tamanho da amostra pode fornecer uma melhor compreensão da capacidade preditiva positiva do método BAT.

A comparação entre um teste de análise de respiração comercial (BAT, TERA. Bio®) e RT-qPCR para diagnóstico SARS-CoV-2 demonstrou precisão satisfatória de 94,4%, 92,6% de sensibilidade para uso diagnóstico, com especificidade de 96% para uso diagnóstico em todos os grupos de participantes. Usados como teste rápido não invasivo no local, os casos positivos devem ser confirmados pelo RT-qPCR. Como o valor preditivo negativo do método foi de 98,97%, o BAT comercial pode ser indicado como um método de triagem para a detecção de casos negativos.

REFERÊNCIAS

ALIZARGAR J, ETEMADI SHM, AGHAMOHAMMADI M, et al, "Saliva samples as an alternative for novel coronavirus (COVID-19) diagnosis," **J. Formos. Med. Assoc.** 119(7), 1234–1235, 2020.

BAKER HA, SAFAVYNIA SA, AND EVERED LA, The “third wave”: impending cognitive and functional decline in COVID-19 survivors.,” **Br. J. Anaesth.** 126(1), 44–47, 2021.

BISWAS A, BANERJEE A, ACHARYYA A, et al, Sources, Detectors, Advanced Materials, and Light-Matter Interactions, **Emerging Trends in Terahertz Solid-State Physics and Devices**, 2020.

CIMERMAN S, CHEBABO A, CUNHA CA, et al, "Deep impact of COVID-19 in the healthcare of Latin America: the case of Brazil", **Brazilian J. Infect. Dis.** 24(2), 93–95, 2020.

COCCOLINI F, PERRONE G, CHIARUGI M, et al, "Surgery in COVID-19 patients: Operational directives", **World J. Emerg. Surg.** 15(1), 1–7, 2020.

DABOUI V, CHANCERELLE Y, CROUZIER D, et al, À la frontière onde-lumière Que peuvent apporter les techniques térahertz (THz) dans le domaine de la santé ?, **Medicine Sciences**, ; 25 : 739-43, 2009.

DIAS VMCH, CARNEIRO M, MICHELIN L, et al, Testes sorológicos para COVID-19: Interpretação e aplicações práticas, **Journal of Infection Control**, 90–101, 2020.

FENG W, NEWBIGGING AM, LE C, et al, "Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs," **Anal. Chem.** 92(15), 10196–10209, 2020.

FORNI G, MANTOVANI A, MORETTA L, et al, Behalf of the COVID-19 Commission of Accademia Nazionale dei Lincei, "COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead," **Cell Death Differ.** 28(2), 626–639, 2021.

HAO W, LI M, ZHANG C, et al, "Inflammatory mediators in exhaled breath condensate and peripheral blood of healthy donors and stable COPD patients.," **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 41(2), 224–230, 2019.

HELLEWELL J, ABBOTT S, GIMMA A, et al, "Feasibility of controlling COVID-19 outbreaks by isolation of cases and contacts", **Lancet Glob. Heal.** 8(4), e488–e496, 2020.

HUFF HV AND SINGH A, "Asymptomatic Transmission During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Implications for Public Health Strategies.," **Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.** 71(10), 2752–2756, 2020.

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ," <https://www.ibmp.org.br/pt-br/info/>, 2020.

JAMES AS AND ALAWNEH JI, "COVID-19 Infection Diagnosis: Potential Impact of Isothermal Amplification Technology to Reduce Community Transmission of SARS-CoV-2.," **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, 10(6), 2020.

KEVADIYA BD, MACHHI J, HERSKOVITZ J, et al, "Diagnostics for SARS-CoV-2 infections," **Nat. Mater**, 2020.

KISLER SM, TEDIJANTO C, GOLDSTEIN EM, et al, "Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the post-pandemic period," **medRxiv**, 860–868, 2020.

KUCIRKA LM, LAUER SA, LAEYENDECKER O, et al, "Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure," **Ann. Intern. Med.** 173(4), 262–267, 2020.

LEUNG NHL, CHU DKW, SHIU EYC, et al, "Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks.," **Nat. Med.** 26(5), 676–680, 2020.

LI Q, GUAN X, WU P, et al, Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia, **N. Engl. J. Med.** 382(13), 1199–1207, 2020.

MATRAJT L, EATON J, LEUNG T, et al, Vaccine optimization for COVID-19: Who to vaccinate first?, **Sci. Adv**, 7(6), 2021.

MEI X, LEE HC, DIAO K, et al, "Artificial intelligence-enabled rapid diagnosis of COVID-19 patients," **Prepr. Serv. Heal. Sci**, 04, 2020.

MEYEROWITZ EA, RICHTERMAN A, GANDHI RT, et al, "Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors," **Ann. Intern. Med.** 174(1), 69–79, 2020.

MUTLU GM, GAREY KW, ROBBINS RA, et al, "Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans.," **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 164(5), 731–737, 2001.

NAGURA-IKEDA M, IMAI K, TABATA S, et al, "Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19.," **J. Clin. Microbiol**, 58(9), 2021.

PALAZ F, KALKAN AK, TOZLUYURT A, AND OZSOZ M, "CRISPR-based tools: Alternative methods for the diagnosis of COVID-19.," **Clin. Biochem.** 89, 1–13, 2021.

PENG K, JEVTICS D, ZHANG F, et al, "Three-dimensional cross-nanowire networks recover full terahertz state," **Science** (80-.). 368, 510–513, 2020.

PENG Y, SHI C, ZHU Y, et al, "Terahertz spectroscopy in biomedical field: a review on signal-to-noise ratio improvement," **Photonix** 1, 2020.

SHUMYATSKY P AND ALFANO RR, "Terahertz sources.," **J. Biomed. Opt.** 16(3), 2011.

SUN Q, HE Y, LIU K, et al, "Recent advances in terahertz technology for biomedical applications.," **Quant. Imaging Med. Surg.** 7(3), 345–355, 2017.

THE CENTRE FOR EVIDENCE-BASED MEDICINE , "COVID-19: What proportion are asymptomatic? - Centre for Evidence-Based Medicine," <https://www.cebm.net/covid-19/covid-19-what-proportion-are-asymptomatic/>.

VOHRA N, BAILEY K, AND EL-SHENAWE M, Terahertz Experimental Measurements of Human Breast Tissue, **IEEE Conference Publication | IEEE Xplore**, 2020.

XAVIER AR, SILVA JS, ALMEIDA JPCL, et al, "COVID-19: Clinical and laboratory

manifestations in novel coronavirus infection," **J. Bras. Patol. e Med. Lab.** 56,1–9, 2020.

WORD HEALTH ORGANIZATION, "COVID-19 Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.1.0," <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1>, 2020.

WORD HEALTH ORGANIZATION, "Diagnostic testing for SARS-CoV-2," <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>, 2020.

YANG Y, YANG M, SHEN C, et al, "Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections," **medRxiv**, 20021493, 2020.

ZWALD ML, LIN W, WEISS C, et al, "Rapid Sentinel Surveillance for COVID-19 - Santa Clara County, California, March 2020.," **MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.** 69(14), 419–421, 2020.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A precisão geral de 94,4% demonstra um bom desempenho do método. Considerando o alto valor preditivo negativo, podemos verificar que é de qualidade suficiente para implementação como método de triagem para casos negativos, tanto em participantes sintomáticos quanto assintomáticos.

Além disso, como tem potencial para apresentar resultados dentro de alguns segundos a minutos, seu uso em larga escala para retomar atividades diárias pode ser vislumbrado.

Novos estudos relacionados a outras doenças em emergência podem surgir na cooperação pré-estabelecida entre o Tecpar e a empresa israelense, como a realização de pesquisas clínicas para verificar a precisão diagnóstica de outras doenças.

Entende-se que a incorporação da tecnologia apresentada como método diagnóstico envolve um potencial geração de conhecimento, proporcionando às

instituições de pesquisa respostas rápidas e viáveis para o tratamento de doenças em saúde pública.

5 ANEXOS

ANEXO I - Parecer Técnico do Comitê Nacional de Ética para Pesquisa Clínica (CONEP)

ANEXO II - Termo de Autorização e Compromisso para Uso de Informações

ANEXO III - Acordo de Confidencialidade

ANEXO IV - Arquivo Brasileiro de Biologia e Tecnologia. Artigo publicado:

"Terahertz Spectroscopy Applied to Diagnostics in Public Health: A Review".

6 VITA

Meila Bastos de Almeida é Mestre em Saúde Única pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná e graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria. Atualmente é Analista em Biotecnologia no Instituto de Tecnologia do Paraná, Tecpar, exercendo o cargo de Assessora da Diretoria Industrial da Saúde. Exerce também o cargo de Diretora de Relações Institucionais no Instituto de Biologia Molecular do Paraná, IBMP.

ANEXO I - Parecer Técnico do Comitê Nacional de Ética para Pesquisa Clínica
(CONEP)

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos técnicos de viabilidade para diagnóstico de Covid-19 por teste rápido não invasivo

Pesquisador: ANA PAULA GORI PALKA

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 5

CAAE: 35555720.7.0000.5225

Instituição Proponente: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
TERA BRASIL COMERCIO DE MATERIAIS MEDICOS E HOSPITALARES LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.234.085

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1595122.pdf, de 10/07/2020) e/ou do Projeto Detalhado (TECPAR_TERA_ANALISE_COVIDversaoCEP10jul2020.pdf, de 15/07/2020).

Introdução:

O surto do novo coronavírus, inicialmente denominado 2019-nCoV, assim que descrito em Wuhan China, e agora conhecido como SARS-CoV2, resultou na declaração de estado de pandemia pela OMS em 11 de março de 2020(1). O estado de exceção e ineditismo determinado pela pandemia implicou em grandes transformações sociais, com enorme impacto (imediate e tardio) sobre a saúde pública e privada mundial. No Brasil, o primeiro caso foi detectado em 25 de fevereiro de 2020 e o poder público estabeleceu medidas de prevenção e controle da COVID-19, seguindo critérios epidemiológicos, sanitários e legais(2). É incerto saber qual será o padrão futuro da atividade da COVID-19, mas certamente há grande impacto para o Brasil(2). Entretanto é certo um fato a ser analisado, o caráter dinâmico da evolução, assim como diferenças no seu comportamento regional em nosso país continental, sem mencionar as abissais diferenças regionais na qualidade dos serviços de saúde pública e privada. A distribuição da crise sanitária

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

não é homogênea e simultânea em todo o planeta. No Brasil, um país de dimensões continentais, a distribuição é díspar assim como o período dos picos de infecção viral. Nesse sentido o poder público tem um papel fundamental na avaliação permanente do comportamento geográfico da disseminação da COVID-19. Por outro lado, a pandemia não impediu a evolução natural de afecções não relacionadas ao novo coronavírus. Os Sistemas de Saúde em todo o mundo estão sendo desafiados, como nunca antes na história recente. Um dilema se estabelece: Como retornar o cotidiano sem acarretar em maiores complicações? Imprescindível destacar que a retomada de forma não estruturada pode resultar em aumento da mortalidade(8–10)(11)Uma forma possível é buscar métodos diagnósticos rápidos de baixo custo e alta efetividade. Caso seja possível encontrar um método que consiga fazer o screening em massa, seria possível retomar atividades com segurança.

Dentro das possibilidades aventadas, estão métodos diagnósticos através de equipamentos de sopro, semelhantes aos bafômetros, que possam detectar diretamente a presença o afirmar a inexistência de vírus SARS-CoV-2. A literatura mundial aponta uma vasta literatura de métodos em desenvolvimento para análise de VOC (Volatile Organic Chemicals) para diagnóstico de pneumonias por variados patógenos. (3–7)A empresa Tera de Israel desenvolveu pesquisas iniciais na área de diagnóstico de SARS-CoV-2 através de análise de sopro (Breath Analysis) com resultados promissores conforme apontados em resultados preliminares. Após acordo internacional entre a empresa Tera de Israel e o Estado do Paraná, foi proposto um protocolo de análise de efetividade da tecnologia de forma prospectiva conforme protocolo anexo.

Hipótese:

Caso seja possível encontrar um método que consiga fazer o screening em massa, seria possível retomar atividades com segurança.

Metodologia Proposta:

Deteção da presença de VOC (Volatile Organic Chemicals) de SARS CoV-2 em amostras colhidas de pacientes testados por características espectrais na banda THz em amostras de ar expirado na membrana de um tubo de ensaio de análises respiratórias. A análise espectral é feita no espectro de 300-3000GHz.O RT-PCR será realizado pelo LACEN ou IBMP de acordo com o protocolo atual será considerado o comparador padrão ouro. O grupo que realizará o PCR está cego aos resultados da Tera Teste de análise de sopro (BAT: Breath Analysis Test) realizado por técnicos cegos para o resultado da PCR.Se o PCR for positivo e o BAT é negativo, o BAT deve ser repetido

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

assim que o resultado do PCR estiver disponível.

Se o BAT teste for positivo e o PCR for negativo, o PCR deve ser repetido assim que possível. Se tanto BAT quanto PCR são concordantes (negativos ou positivos), nenhum exame precisa ser repetido

Critério de Inclusão:

Masculino e Feminino.

Idade 18 anos.

O paciente deve aceitar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

O status de portador do vírus SARS-COV-2 será determinado em uma amostra coletada ao mesmo tempo que o teste de análise da respiração (BAT).

Casos ambulatoriais.

Sintomático e assintomático.

Critério de Exclusão:

Pacientes hospitalizados.

Sujeitos sob anestesia geral.

A incapacidade de assinar pessoalmente o termo de consentimento.

A incapacidade de soprar 5x no teste. Amostras de BAT analisadas após 6h.

Impossibilidade de ter uma segunda amostra.

Pacientes sintomáticos com mais de 5 dias de sintomas para a primeira amostra de PCR ou mais de 7 dias para repetição.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Desenvolvimento de um teste rápido, barato e assertivo para descartar SARS CoV-2 em ar expirado.

Objetivos Secundários

Estabelecer o banco de dados preliminar para um estudo de viabilidade rápida. Se for constatado que o vírus pode de fato ser identificado (True positive), ou casos descartados (True negativo), a pesquisa deve ser ampliada para permitir o desenvolvimento rápido de testes de triagem para SARS CoV-2.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Como os dados preliminares do estudo referem-se a um número pequeno de pacientes, o risco é que em uma amostragem maior esses dados não sejam extrapolados.

Benefícios:

Trata-se da fase de desenvolvimento final de uma aplicação para diagnósticos biológicos de Covid-19. Dados preliminares apontam o potencial de aplicação do método para diagnóstico de pacientes negativos para Covid-19. Alternativa não invasiva para coleta de amostra de respiração. Resposta rápida para pacientes negativos. A validação do método representa uma opção importante na liberação da circulação de pessoas em espaços de grande circulação ou aglomerações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Detecção da presença de VOC (Volatile Organic Chemicals) de SARS CoV-2 em amostras colhidas de pacientes testados por características espectrais na banda THz em amostras de ar expirado na membrana de um tubo de ensaio de análises respiratórias. A análise espectral é feita no espectro de 300-3000GHz.

O RT-PCR será realizado pelo LACEN ou IBMP de acordo com o protocolo atual será considerado o comparador padrão-ouro. O grupo que realizará o PCR está cego aos resultados da Tera.

Teste de análise de sopro (BAT: Breath Analysis Test) realizado por técnicos cegos para o resultado da PCR.

Se o PCR for positivo e o BAT é negativo, o BAT deve ser repetido assim que o resultado do PCR estiver disponível. Se o BAT teste for positivo e o PCR for negativo, o PCR deve ser repetido assim que possível.

Se tanto BAT quanto PCR são concordantes (negativos ou positivos), nenhum exame precisa ser repetido.

1. Grupo 1.1 – PCR sintomático positivo
2. Grupo 1.2 – PCR sintomático negativo
3. Grupo 2.1 – PCR assintomático positivo
4. Grupo 2.2 – PCR assintomático negativo

O estudo está previsto para incluir um mínimo de 1.500 participantes testados verificados como

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

portadores COVID-19, e um mínimo de 1500 participantes verificados como não-portadores. Entretanto, haverá uma análise provisória quando 100 PCR positivos foram incluídos. Essa análise fornecerá dados adicionais para ajustar o número total de pacientes a serem testados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise de respostas ao parecer pendente nº 4.219.100 emitido pela Conep em 18/08/2020:

1. Quanto a Folha de Rosto:

1.1. Os documentos submetidos ao Sistema CEP/Conep que necessitam de assinatura dos responsáveis devem ser encaminhados, preferencialmente, com certificação digital ou por documento digitalizado assinado. Será aceita, em caráter excepcional, a dispensa das assinaturas nos documentos necessários para a submissão dos protocolos de pesquisa, durante o período em que estiverem instaladas as medidas de emergência sanitária decorrente da pandemia COVID-19. Recomenda-se que posteriormente sejam encaminhados, via NOTIFICAÇÃO, todos os documentos e declarações pertinentes ao estudo em tela, devidamente preenchidos e assinados. Contudo, é indispensável a assinatura do campo Pesquisador Responsável. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Os documentos que necessitam de assinatura dos responsáveis foram adequados e, portanto, estamos submetendo o documento digitalizado assinado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. No documento Projeto Detalhado, o pesquisador informa que uma parte dos custos da pesquisa destina-se a empresa Terra Brasil. Caso o patrocinador não seja o pesquisador responsável, solicita-se que seja inserida na Plataforma Brasil nova Folha de Rosto com o campo patrocinador devidamente preenchido, datado e assinado (salienta-se que nos casos de agências de fomento não é necessária a assinatura no campo referente ao patrocinador). Solicita-se, adicionalmente, que os dados relacionados ao patrocinador sejam corrigidos na Plataforma Brasil (Item "Financiamento", Aba 3 "Desenho de Estudo/ Apoio Financeiro").

RESPOSTA: A folha de rosto foi alterada, constando, portanto, a assinatura do representante da

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

patrocinadora principal após inserção no item "financiamento da aba 3".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao Projeto Detalhado, documento intitulado "TECPAR_TERA_ANALISE.pdf":

2.1. Solicitam-se esclarecimentos quanto a Participação da empresa Terra de Israel no estudo.

RESPOSTA: No projeto detalhado a participação da equipe da Tera Group LTD de Israel foi mais bem detalhada.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, documento intitulado "TCLE.pdf":

3.1. Na primeira página, lê-se: "Esta PESQUISA é considerada o padrão ouro, ou seja, o melhor método diagnóstico existente." (Destaque nosso). Entende-se que o termo destacado faz menção ao teste de swab (técnica RT-PCR). Para o melhor esclarecimento do participante da pesquisa, solicita-se substituir o termo em destaque.

RESPOSTA: Esclarecido no TCLE que o padrão ouro se refere ao RT-PCR.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.2. Na segunda página, lê-se: "A sua participação neste estudo é voluntária e se o Sr/Sra não quiser mais fazer parte da pesquisa, poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.". Deve ser informado que o TCLE será elaborado em duas vias, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante de pesquisa, conforme Resolução CNS Nº 466 de 2012 itens IV.3.f e IV.5.d.

RESPOSTA: Esclarecido que o TCLE será gerado em duas vias, ficando uma com o paciente.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.3. Deve ser garantido ao participante de pesquisa e seu acompanhante o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Sendo assim, solicita-se garantir, de forma clara e afirmativa, o ressarcimento das despesas tidas pelo participante da pesquisa e de seu acompanhante, se necessário, em decorrência de sua participação na pesquisa, podendo-se citar como exemplo, o transporte e a alimentação, mas não se restringindo a eles (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

II.21 e IV.3.g).

RESPOSTA: Esclarecido no TCLE que o paciente terá o ressarcimento de qualquer despesa relacionada a essa pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.4. Solicita-se que seja expresse, de modo claro e afirmativo no TCLE, o direito a assistência integral gratuita devido a danos diretos/ indiretos e imediatos/ tardios, pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.3.1 e II.3.2).

RESPOSTA: Esclarecido no TCLE que o paciente terá assistência integral pelo tempo que for necessário.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1595122.pdf	20/08/2020 13:28:55		Aceito
Outros	CartaEsclarecimento1908assinada.pdf	20/08/2020 13:17:39	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	CartaEsclarecimento1908.pdf	20/08/2020 13:17:28	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	CartaEsclarecimento1808assinada.pdf	20/08/2020 13:17:16	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	CartaEsclarecimento1808.pdf	20/08/2020 13:16:18	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODECONSENTIMENTO1808vlimpa.pdf	20/08/2020 13:15:42	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
TCLE / Termos de	TERMODECONSENTIMENTO1808dest	20/08/2020	ANA PAULA GORI	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

Assentimento / Justificativa de Ausência	aque.pdf	13:15:35	PALKA	Aceito
Orçamento	Anexo02orcamentotera.xlsx	20/08/2020 13:15:14	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Cronograma	Anexo01cronogramatera.docx	20/08/2020 13:14:38	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado1808digitalizadoASSIN ADO.pdf	20/08/2020 13:14:26	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado1808vlimpa.pdf	20/08/2020 13:13:38	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado1808destaque.pdf	20/08/2020 13:13:19	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado1808.pdf	18/08/2020 14:42:24	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODECONSENTIMENTO1808.pdf	18/08/2020 14:41:11	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	cartaconep1808.pdf	18/08/2020 14:40:00	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto1808.pdf	18/08/2020 14:24:10	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Cronograma	cronogramatera.docx	10/08/2020 08:47:07	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Orçamento	orcamento.xlsx	10/08/2020 08:45:05	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	termodecooperacao.pdf	04/08/2020 13:29:44	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	04/08/2020 13:28:37	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	cartarespostaCEP.pdf	04/08/2020 13:26:49	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TECPAR_TERA_ANALISE.pdf	04/08/2020 13:21:29	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	04/08/2020 13:18:51	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
Outros	RespostaPendencia.pdf	24/07/2020 16:58:06	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_TECPAR.docx	24/07/2020	ANA PAULA GORI	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.234.085

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TECPAR.docx	16:55:29	PALKA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TECPAR_TERA_ANALISE_COVIDvers aoCEP10jul2020.pdf	15/07/2020 16:39:23	ANA PAULA GORI PALKA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 25 de Agosto de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conepe@saude.gov.br

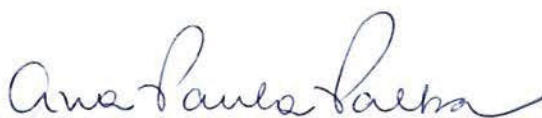
ANEXO II - Termo de Autorização e Compromisso para Uso de Informações

TERMO DE AUTORIZAÇÃO E COMPROMISSO PARA USO DE INFORMAÇÕES

Eu, Ana Paula Gori Palka, Analista em Biotecnologia do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, pesquisadora principal do projeto de pesquisa intitulado: “Estudos técnicos de viabilidade para diagnóstico de Covid-19 por teste rápido não invasivo”, submetido na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CONEP, que tem como objetivo principal o desenvolvimento de um teste rápido, barato e assertivo para descartar SARS CoV-2 em ar expirado, **autorizo** a pesquisadora Meila Bastos de Almeida, membro da equipe e coordenadora do estudo clínico, a utilizar os dados obtidos na referida pesquisa em sua tese de doutorado.

Esta autorização está sendo concedida desde que as seguintes premissas sejam respeitadas: as informações serão utilizadas única e exclusivamente para publicação em artigos científicos e tese; o pesquisador se compromete a preservar as informações confidenciais constantes nos bancos de dados da instituição, garantindo o sigilo e a privacidade dos participantes

Curitiba, 30 de agosto de 2020



Ana Paula Gori Palka

CPF 551 730 809 - 06

ANEXO III - Acordo de Confidencialidade

ACORDO DE CONFIDENCIALIDADE

Este Acordo é celebrado no dia 30 de abril de 2020 (a "data de vigência") entre a Terahertz Group Ltd., uma empresa organizada e existente sob as leis de Israel, com endereço na 60 Ramat Yam St., Herzliya 4685160, Israel, (doravante denominada "TeraGroup"), representada por Oren Sadiv, e TECPAR – INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ, empresa pública estadual de direito privado, criada pela Lei Estadual nº 7.056/78, com sede na Cidade de Curitiba, Estado do Paraná, na Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, nº 3775, Cidade Industrial de Curitiba - CIC, CEP 81350-010, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 77.964.393/0001-88 (doravante denominada "TECPAR"), representada por Jorge Augusto Callado Afonso. A TeraGroup e o TECPAR podem ser doravante denominadas coletivamente como "Partes" ou individualmente como "Parte".

CONSIDERANDO que, o TeraGroup e o TECPAR desejam iniciar discussões preliminares sobre a possibilidade de entrar em uma transação comercial prospectiva com relação a plataforma de tecnologia de depuração precoce BioSafety COVID-19 da TeraGroup e seu teste/desenvolvimento no Brasil.

CONSIDERANDO que, a TeraGroup e o TECPAR, na consecução de tais discussões, podem trocar informações financeiras, de marketing, vendas, científicas, de desenvolvimento ou outras informações confidenciais;

CONSIDERANDO que, a TeraGroup e o TECPAR desejam manter a confidencialidade de tais informações, impedindo a sua divulgação não autorizada.

FICA ACORDADO:

Que pelas promessas feitas neste instrumento, seus interesses mútuos e individuais, e outras contraprestações boas e valiosas, cujo recebimento e suficiência são ora reconhecidos, a TeraGroup e o TECPAR concordam com o

CONFIDENTIALITY AGREEMENT

This Confidentiality Agreement (this "Agreement") is executed and entered into on April 30th, 2020 (the "Effective Date"), by and between Terahertz Group Ltd., a company organized and existing under the laws of Israel with office located at 60 Ramat Yam St., Herzliya 4685160, Israel, (hereinafter referred to as "TeraGroup"), represented by Mr. Oren Sadiv, and TECPAR – INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ, a public company under a private law, with address of Professor Algacyr Munhoz Mader, nº 3775, Curitiba Industrial City-PR, CNPJ 77.964.393/0001-88 (hereinafter referred to as "TECPAR"), represented by Jorge Callado. TeraGroup and TECPAR may be hereinafter collectively referred to as "Parties" or individually as "Party."

WHEREAS, TeraGroup and TECPAR wish to start preliminary discussions about the possibility of entering into a prospective business transaction concerning TeraGroup's proprietary BioSafety COVID-19 Early Clearance technology platform and its testing/deployment in Brazil.

WHEREAS, TeraGroup and TECPAR, in furtherance of such exploration and discussions, may exchange certain financial, marketing, sales, scientific, technical, technological, development or other proprietary information.

WHEREAS, TeraGroup and TECPAR each wish to maintain the confidentiality of such information by preventing its unauthorized disclosure.

WITNESSETH:

That for and in consideration of the promises made herein, their mutual and individual interests, and other good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of all of which is hereby acknowledged, TeraGroup and

05.3

seguinte:

I. DEFINIÇÃO DE INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS

Para efeitos do presente Acordo, "Informações Confidenciais" inclui, mas não está limitado a, todas as anotações, livros, papéis, diagramas, documentos, relatórios, e-mails, memorandos, observações visuais, comunicações orais e todos os outros dados ou informações em qualquer forma, divulgados por uma parte e / ou suas afiliadas para a outra parte e / ou suas afiliadas, incluindo aquelas feitas antes da assinatura deste Acordo. Para efeitos do presente Acordo, "afiliadas" significa, em relação a uma das Partes, qualquer entidade, direta ou indiretamente, que controle, seja controlada por ou esteja sob controle comum com tal Parte, somente enquanto este controle existir. Para efeitos da presente definição "controle" significa (i) no caso de pessoa jurídica, a propriedade direta ou indireta de mais de cinquenta por cento (50%) das ações ou quotas com direito a voto (ou percentual inferior que seja o máximo permitido para ser possuído por uma empresa estrangeira em uma determinada jurisdição) para a eleição de diretores dessa entidade ou (ii) no caso de uma entidade que não seja uma pessoa jurídica, a posse, direta ou indiretamente, o poder de direção, ou promoção da direção, gestão ou políticas de tal entidade, seja através da titularidade de títulos com direito a voto, por contrato ou de outra forma; e os termos "controle", "controlado por" ou "sob controle comum", terão os significados comparáveis ao que precede.

II. TROCA DE INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS

A TeraGroup e o TECPAR concordam em fornecer uma à outra e / ou suas respectivas afiliadas tais Informações Confidenciais, conforme definição do termo na Cláusula I deste instrumento, conforme a Parte divulgadora, a seu exclusivo critério, considere necessário que a Parte receptora avalie as matérias contempladas neste instrumento. Salvo com relação ao Objeto, nem a TeraGroup nem o

TECPAR agree as follows:

I. DEFINITION OF CONFIDENTIAL INFORMATION

For purposes of this Agreement, "Confidential Information" includes, but is not limited to, all notes, books, papers, diagrams, documents, reports, e-mail, memoranda, visual observations, oral communications, tangible illustrations and all other data or information in whatever form, disclosed by one Party and/or its Affiliates to the other Party and/or its Affiliates, including those made prior to the execution of this Agreement. For purposes of this Agreement, "Affiliates" shall mean with respect to either Party, any entity, directly or indirectly, controlling, controlled by or under common control with such Party, for only so long as such control exists. For purposes of this definition, "control" means (a) in case of corporate entity, direct or indirect ownership of more than fifty percent (50%) of the stock or shares having the right to vote (or such lesser percentage which is the maximum allowed to be owned by a foreign corporation in a particular jurisdiction) for the election of directors of such entity; or (b) in the case of an entity that is not a corporate entity, the possession, directly or indirectly, of the power to direct, or cause the direction of, the management or policies of such entity, whether through the ownership of voting securities, by contract or otherwise; and the terms "controlling," "controlled by" or "under common control" shall have the meanings comparable to the foregoing.

II. EXCHANGE OF CONFIDENTIAL INFORMATION

TeraGroup and TECPAR agree to provide one another and/or their respective Affiliates with such Confidential Information, as that term is defined in Article I herein, as the disclosing Party, in its sole discretion, deems necessary for the receiving Party to evaluate the matters contemplated herein. Except in connection with the evaluation of the Possible Transaction, neither TeraGroup nor TECPAR will use for any

TECPAR usarão para quaisquer outros fins, nem promoverão ou autorizarão o uso por outros, diretamente ou indiretamente, de quaisquer Informações Confidenciais divulgadas neste Acordo sem o consentimento prévio por escrito da Parte divulgadora.

III. CONFIDENCIALIDADE

A TeraGroup e o TECPAR concordam que o destinatário das Informações Confidenciais não deverá divulgar, promover, ou permitir a divulgação de tais Informações Confidenciais a qualquer terceiro ou terceiros, sem prejuízo das exceções contidas nas Cláusulas V, VI e VII deste instrumento, sem o prévio consentimento por escrito da Parte divulgadora.

TeraGroup e TECPAR devem manter e reter Informações Confidenciais recebidas da outra parte em estrita confiança e exercício de etapas e precauções razoáveis (e, em qualquer caso, não menos que ela se aplica a sua própria Informação Confidencial) para proteger a confidencialidade de tais informações Confidenciais. TECPAR concorda que, sem o consentimento escrito anterior da outra parte, ele não irá direcionar seus representantes (Como definido no artigo V Abaixo) não para, expor a qualquer parte (a) que as Informações Confidenciais foram disponibilizadas para o mesmo ou seus Representantes, (b) que as discussões ou negociações devem tomar ou terem ocorrido com relação a uma Possível Transação entre as partes ou (c) qualquer um dos termos, condições ou outros fatos com relação a qualquer tal Transação Possível, incluindo, sem limitação, o seu estado.

IV. DESTRUIÇÃO E RETENÇÃO DE INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS

A qualquer momento mediante solicitação escrita da outra Parte, exceto se houver disposição legal em contrário ou demais exceções aqui aplicáveis, a Parte recebedora das informações confidenciais irá destruí-las e confirmar a respectiva destruição à outra Parte

other purpose(s), nor cause or permit to be used by others, either directly or indirectly, any Confidential Information disclosed hereunder without the prior written consent of the Party making such disclosure.

III. CONFIDENTIALITY

TeraGroup and TECPAR agree that the recipient of the Confidential Information shall not disclose, cause, or permit to be disclosed said Confidential Information to any third party or parties, subject to the exceptions contained in Articles V, VI and VII herein, without the prior written consent of the disclosing Party.

TeraGroup and TECPAR shall keep and retain Confidential Information received from the other Party in strict confidence and exercise reasonable steps and precautions (and in any case not less than it applies to its own Confidential Information) to safeguard the confidentiality of such Confidential Information. TECPAR agree that, without the prior written consent of the other Party, it will not, and will direct its Representatives (as defined in Article V below) not to, disclose to any third party (a) that the Confidential Information has been made available to it or its Representatives, (b) that discussions or negotiations are taking or have taken place concerning a Possible Transaction between the Parties or (c) any of the terms, conditions or other facts with respect to any such Possible Transaction, including, without limitation, the status thereof.

IV. DESTRUCTION AND RETENTION OF CONFIDENTIAL INFORMATION

At any time upon written request of the other Party, except as required by law or regulation, and subject to the exceptions set forth herein, the receiving Party will destroy the Confidential Information received from the disclosing Party and confirm to the disclosing Party in writing

por escrito. Não obstante o acima exposto ou qualquer outra provisão em contrário constante neste Acordo, (a) a obrigação de destruir e confirmar a destruição não se aplica a (i) qualquer arquivo ou registro que fora criado automaticamente pelo sistema de arquivamento e backup da Parte recebedora ou (ii) qualquer nota, relatórios, apresentações ou outros documentos ou materiais de todas as formas preparados pela Parte recebedora ou seus representantes em concordância com a avaliação feita pela Parte recebedora em relação à Potencial Transação (juntos chamados de "Material de Avaliação"); e (b) a Parte recebedora pode manter um arquivo da informação confidencial de acordo com suas políticas, apenas para demonstrar a sua conformidade com os termos e condições deste Acordo, desde que tais arquivos, registros, materiais de avaliação e cópias de arquivos passem a estar sujeitos às obrigações de confidencialidade da Parte recebedora, consoante estabelecido neste Acordo.

V. DIVULGAÇÃO

As Informações Confidenciais podem ser divulgadas aos funcionários, diretores, administradores, assessores, assessoria jurídica, contadores, fontes de financiamento, consultores terceirizados, agentes e conselheiros (em conjunto, "Representantes") da TeraGroup ou do TECPAR; desde que estes cujas Informações Confidenciais foram divulgadas, relacionadas ou sobre as matérias contempladas neste instrumento, estejam sob as obrigações de confidencialidade pelo menos tão restritiva quanto as deste Acordo. A TeraGroup e o TECPAR concordam em fazer cumprir os termos e as disposições de confidencialidade do presente Acordo e quaisquer dos seus representantes que receberem as Informações Confidenciais nos termos deste instrumento, e serem responsáveis pela violação das obrigações de confidencialidade, por qualquer de seus Representantes e/ou Afiliados.

such destruction. Notwithstanding the foregoing or any other provision in this Agreement to the contrary, (a) the obligation to destroy and confirm does not apply to (i) any computer records or files that have been created pursuant to the receiving Party's automatic archiving and back-up procedures; and (b) the receiving Party may retain one archival copy of the Confidential Information in accordance with its policies, solely to demonstrate its compliance with the terms and conditions of this Agreement; provided, that such computer records, files, Evaluation Materials and archival copy shall otherwise be subject to the receiving Party's confidentiality obligations in accordance with the terms of this Agreement.

V. DISCLOSURE

Confidential Information may be disclosed to employees, directors, officers, advisors, legal counsel, accountants, financing sources, third party consultants, agents, and advisors (collectively, "Representatives") of either TeraGroup or TECPAR and/or their respective Affiliates, provided that such Representatives and/or Affiliates need to know the Confidential Information for the evaluation of the Possible Transaction and provided that those to whom Confidential Information is disclosed, regarding or concerning the matters contemplated herein, shall be under obligations of confidentiality at least as restrictive as those of this Agreement. TeraGroup and TECPAR agree to enforce the confidentiality terms and provisions of this Agreement as to any such of its Representatives and/or Affiliates who receives Confidential Information hereunder, and to be liable for breach of confidentiality obligations by any of its Representatives and/or Affiliates.

BS.

VI. EXCEÇÕES

Não obstante qualquer disposição em contrário neste instrumento, o destinatário de Informações Confidenciais divulgadas neste instrumento não possuem o dever de manter a confidencialidade de quaisquer Informações Confidenciais que:

- a) No momento da divulgação eram de domínio público.
- b) Após a divulgação se tornem uma parte do domínio público sem culpa, ação ou omissão, erro, esforço ou violação deste Acordo pelo destinatário.
- c) É conhecida pelo destinatário no momento da divulgação.
- d) É descoberta pelo destinatário independentemente de qualquer divulgação pela Parte divulgadora.
- e) É obtida de terceiro que adquiriu o direito de possuir e divulgar as Informações Confidenciais.
- f) Se uma decisão, estatuto ou regulamento de qualquer autoridade governamental ou outra compulsão legal exija que uma Parte divulgue as Informações Confidenciais a qualquer órgão federal ou estadual, tribunal ou outro órgão, esta Parte pode fazer tal divulgação; desde que, no entanto, tal Parte utilize seus melhores esforços, sob as circunstâncias para notificar a Parte divulgadora, a fim de fornecer ou permitir à Parte divulgadora a oportunidade de obter providências cautelares ou outras medidas que possam ser concedidas pelo tribunal ou outra entidade.

VII. VIGÊNCIA DO ACORDO

O termo deste Acordo irá começar na Data Eficaz e expirará um (1) ano a Partir da Data efetiva, após O Que As Obrigações da parte receptora para revelar a parte devem ser limitadas a não descrição e não utilização da Informação confidencial da parte que descreve por Um período global de (60) meses a partir da data eficaz.

VIII. RECURSOS

05.

VI. EXCEPTIONS

Notwithstanding anything to the contrary contained herein, the recipient of Confidential Information disclosed hereunder shall be under no duty to maintain the confidentiality of any such Confidential Information which:

- a) at the time of disclosure is within the public domain;
- b) after disclosure becomes a part of the public domain through no fault, act or failure to act, error, effort or breach of this Agreement by the recipient;
- c) is known to the recipient at the time of disclosure;
- d) is discovered by the recipient independently of any disclosure by the disclosing Party;
- e) is obtained from a third party who to the recipient's actual knowledge has no restriction on possessing and disclosing such Confidential Information.
- f) If a Party is required by order, statute or regulation of any government authority or other legal compulsion to disclose Confidential Information to any federal or state agency, court or other body, such Party may make such disclosure; *provided*, however, that, to the extent legally permissible and reasonably practicable, such Party shall notify the disclosing Party so as to provide or afford the disclosing Party the opportunity to obtain such protective orders or other relief as the compelling court or other entity may grant and/or as available under applicable law.

VII. TERM OF AGREEMENT

The term of this Agreement shall begin on the Effective Date and shall expire one (1) year from the Effective Date, after which Receiving Party's obligations to Disclosing Party shall be limited to non-disclosure and non-use of the Disclosing Party's Confidential Information for an overall period of (60) months from the Effective Date.

VIII. REMEDIES

Tanto a TeraGroup quanto o TECPAR reconhecem que as disposições de confidencialidade contidas neste instrumento são razoáveis considerando a natureza dos seus respectivos negócios e as Informações Confidenciais que cada um irá revelar durante suas discussões, e que qualquer violação de suas respectivas obrigações neste contrato pode causar à outra Parte danos irreparáveis pelos quais a Parte prejudicada pode não ter nenhum recurso legal adequado. Como resultado, a Parte lesada terá direito a buscar reparação justa contra qualquer violação deste instrumento, além do direito de afirmar qualquer outro recurso que possa ter nos termos deste Acordo ou segundo a lei ou em equidade.

IX. ACORDO INTEGRAL

Os termos e condições contidos neste instrumento expressam o acordo integral entre a TeraGroup e o TECPAR no que se refere à troca de Informações Confidenciais, substituem todas as minutas e/ou entendimentos anteriores e não criam nenhuma outra obrigação ou relação entre elas.

X. MODIFICAÇÃO

Este Acordo somente pode ser alterado, aditado ou modificado de outra forma através de uma declaração escrita; desde que tal declaração manifeste a sua intenção de alterar este Acordo e especificamente descreva tais alterações. Quaisquer alterações manuscritas no presente Acordo não serão válidas quanto a qualquer uma das Partes, salvo se rubricadas na margem por um representante autorizado da tal Parte.

XI. VIAS/ASSINATURAS POR FAC-SÍMILE/TRANSMISSÃO ELETRÔNICA

Este Acordo pode ser assinado em duas vias sendo cada via considerada uma original, e, em conjunto, um mesmo documento. Este acordo também pode ser assinado através de fac-símile

6.5.

Both TeraGroup and TECPAR acknowledge that the confidentiality provisions contained herein are reasonable in view of the nature of their respective businesses and the Confidential Information they will each disclose during their discussions, and that any breach of their respective obligations hereunder may cause the other irreparable harm for which the Party harmed may have no adequate remedy at law. As a result, the aggrieved Party shall be entitled to seek equitable relief, including injunctive relief and specific performance, against any breach hereof, in addition to the right to assert any other remedy it may have under this Agreement or otherwise at law or in equity.

IX. ENTIRE AGREEMENT

The terms and conditions contained herein express the entire agreement between TeraGroup and TECPAR insofar as the exchange of Confidential Information in connection with the evaluation of the Possible Transaction is concerned, supersede all prior drafts and/or understandings and create no other obligation or relationship between them.

X. MODIFICATION

This Agreement may be changed, amended or otherwise modified only by a written statement signed by the authorized representatives of both Parties; *provided* that such statement expresses their intent to change this Agreement and specifically describes such change(s). Any handwritten changes to this Agreement will not be effective as to either Party unless initialed in the margin by an authorized representative of such Party.

XI. COUNTERPARTS/ELECTRONIC TRANSMISSIONS

This Agreement may be signed in two (2) counterparts, each of which is to be considered an original, and taken together as one and the same document. This Agreement and any

ou transmissão eletrônica (ex.: documentos em formato PDF), e as assinaturas obtidas dessa maneira serão consideradas originais. Ao ser requerido pela outra Parte, as vias originais devem ser refeitas e entregues para quem as tenha solicitado.

XII. COMPETÊNCIA DAS PARTES

As Partes declaram e garantem à outra que está plenamente autorizada a assinar este Acordo e a se vincular e/ou vincular sua principal, se houver, e a realizar suas obrigações neste Acordo de acordo com os termos previstos no mesmo. As partes ainda declaram que sua assinatura do presente Acordo e o cumprimento das suas obrigações neste instrumento, não violam e não violarão quaisquer obrigações que possam ter perante terceiros. Nada neste Acordo obriga as Partes a consumarem qualquer outra transação.

XIII. PROPRIEDADES INTELECTUAIS

Este Acordo não concede nenhum direito autoral, de marca, segredos comerciais, direitos de patente ou licenças, expresso ou implícito a qualquer Parte.

Sem direitos de propriedade ou licença (expressamente, por implicação, embargo ou de outra forma), sob qualquer patente, direito autoral, segredo industrial ou pedido do mesmo, *Know-how* ou informações confidenciais são aqui Concedidas ou implicadas por qualquer parte para a outra parte pela revelação de informação confidencial e/ou por qualquer outro ato feito como parte de e/ou conforme este Acordo de Confidencialidade.

XIV. LEI APLICÁVEL

Todas e quaisquer ações entre as partes sobre a interpretação ou a aplicação de qualquer termo

amendments hereto, to the extent signed and delivered by means of electronic transmission (e.g., portable document format (.pdf)), shall be treated in all manner and respects as an original contract and shall be considered to have the same binding legal effects as if it were the original signed version thereof delivered in person. At the request of a Party, the other Party shall re-execute original forms thereof and deliver them to the Party who made said request.

XII. AUTHORITY OF PARTIES

Each Party represents and warrants to the other Party that it is fully authorized to execute this Agreement and to bind itself and/or its principal, if any, and to perform its obligations hereunder according to the terms set forth herein. Each Party further represents that its execution of this Agreement and performance of its obligations hereunder, are not and will not be in violation of any obligations it may have to any third party. Nothing in this Agreement will obligate the Parties to consummate any transaction.

XIII. INTELLECTUAL PROPERTIES

This Agreement does not give any copyright rights, trademark, commercial secrets, patent rights or licenses, expressed or implicit in any part.

No right of ownership or license (expressly, by implication, embargo or otherwise), under any patent, copyright, industrial secret or application Thereof, *Know-how* or confidential Information is granted here or implied by any part of this agreement to the other party by the disclosure of confidential information and/or by any other act made as Part of this agreement.

XIV. GOVERNING LAW

Any and all actions between the Parties regarding the interpretation or application of any

ou disposição contida neste instrumento serão regidas por e interpretadas de acordo com as leis do Brasil.

XV. SUBMISSÃO À JURISDIÇÃO

Qualquer litígio ou controvérsia entre as Partes, decorrente do presente Memorando ou a ele relacionado, incluindo, mas não se limitando a litígio ou controvérsia relativo à interpretação de qualquer disposição ou à validade ou exequibilidade de qualquer termo ou condição ou à validade ou exequibilidade do presente Memorando como um todo ou a violação de quaisquer disposições do presente Memorando, será submetido ao Poder Judiciário.

Na hipótese de as Partes recorrerem à tutela judicial nos termos desta Cláusula, fica eleito o foro Central da Comarca da Região Metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, com exclusão de qualquer outro tribunal, por mais privilegiado que seja.

XVI. NOTIFICAÇÕES

Qualquer notificação deverá ser feita por escrito e entregue em pessoa, por serviço de correspondência nacionalmente reconhecido com aviso de recebimento, e será considerada entregue a partir do recebimento, endereçado à TeraGroup, Ramat Yam St., Herzliya 4685160, Israel, aos cuidados de Oren Sadiv.

XVII. ELABORAÇÃO DO DOCUMENTO

As Partes reconhecem que este Acordo é um produto das negociações e que nenhuma inferência deve ser estabelecida em relação a elaboração do presente Acordo.

XVIII. AUTONOMIA DAS CLÁUSULAS

Na medida em que qualquer disposição ou termo definido neste contrato for ou se tornar

term or provision contained herein shall be governed by and interpreted in accordance with the laws of Brazil.

XV. SUBMISSION TO JURISDICTION

Any dispute or controversy between the Parties arising out of or related to this Memorandum, including, but not limited to, dispute or controversy regarding the interpretation of any provision or the validity or enforceability of any term or condition or the validity or enforceability of this Memorandum as a whole or the violation of any provisions of this Memorandum, will be submitted to the Judiciary.

In the event that the Parties resort to judicial protection under the terms of this Clause, the Central Court of the District of the Metropolitan Region of Curitiba, State of Paraná is elected, excluding any other court, however privileged it may be.

XVI. NOTICES

Any notice required or permitted to be given hereunder shall be in writing and shall be delivered in person, by a nationally recognized overnight courier, or by registered or certified airmail, postage prepaid to the addresses given above or such other addresses as may be designated in writing by the Parties from time to time, and shall be deemed to have been given upon receipt. For notices to TeraGroup, a copy of such notice shall be sent to 60 Ramat Yam St., Herzliya 4685160, Israel, Attention: Oren Sadiv.

XVII. DOCUMENT PREPARATION

The Parties acknowledge that this Agreement is a product of negotiations and that no inference should be drawn regarding the drafting of this Agreement.

XVIII. SEVERABILITY

To the extent any provision or term set forth herein is or becomes unenforceable by operation of law, such unenforceability shall not affect the

G.S.

inexequível por força de lei, tal inexequebilidade não afetará as demais disposições deste Acordo. As Partes acordam em renegociar de boa-fé qualquer disposição ou termo considerado inexequível e se vincular a disposição substituta mutuamente acordada.

XIX. SINGULAR E PLURAL

A forma singular de qualquer substantivo ou pronome incluirá o plural quando o contexto em que uma palavra é usada é tal que fica evidente que o singular destina-se a incluir o plural ou vice-versa.

EM TESTEMUNHO de seu acordo com os termos e condições contidos neste documento, a TeraGroup e TECPAR fizeram com que esse documento fosse assinado na Data da Vigência.

remaining provisions of this Agreement. The Parties agree to renegotiate in good faith any provision or term held to be unenforceable and to be bound by the mutually agreed substitute provision.

XIX. SINGULAR AND PLURAL

The singular form of any noun or pronoun shall include the plural when the context in which such a word is used is such that it is apparent the singular is intended to include the plural or vice versa.

IN WITNESS of their agreement to the terms and conditions contained herein, TeraGroup and TECPAR have caused the following signatures to be affixed hereto as of the Effective Date.

Curitiba, 30 de abril de 2020.


Terahertz
Group Ltd
516034147

TERAHERTZ GROUP LTD.
Oren Sadiv


INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ
Jorge Augusto Callado Afonso

ANEXO IV - Arquivo Brasileiro de Biologia e Tecnologia. Artigo publicado:

"Terahertz Spectroscopy Applied to Diagnostics in Public Health: A
Review".

Review - 75 Years - Special Edition

Terahertz Spectroscopy Applied to Diagnostics in Public Health: A Review

Meila Bastos de Almeida^{1*}

<https://orcid.org/0000-0002-5217-6417>

Letícia Schiavo¹

<https://orcid.org/0000-0003-3279-5138>

Elis Esmanhoto¹

<https://orcid.org/0000-0002-7430-4715>

Cesar Antonio Lenz¹

<https://orcid.org/0000-0001-6638-6557>

Jaime Rocha¹

<https://orcid.org/0000-0002-3749-6826>

Marcelo Loureiro¹

<https://orcid.org/0000-0001-9044-4534>

Louise Bach Kmetiuk²

<https://orcid.org/0000-0001-6579-1278>

Alexander Welker Biondo³

<https://orcid.org/0000-0002-4182-5821>

Ivan Roque de Barros Filho³

<https://orcid.org/0000-0002-0056-9358>

¹Paraná Institute of Technology-TECPAR, Curitiba, Paraná, Brazil; ²Oswaldo Cruz Foundation, Carlos Chagas Institute, Curitiba, Paraná, Brazil; ³Federal University of Paraná State, Department of Veterinary Medicine, Curitiba, Paraná, Brazil.

Editor-in-Chief: Alexandre Rasi Aoki

Associate Editor: Bruno Pedroso

Received: 2020.12.06; Accepted: 2021.05.07.

*Correspondence: meilaba@tecpar.br; Tel.: +55-41-99925-9040 (M.B.A).

HIGHLIGHTS

- Terahertz (THz) spectroscopy may help to detect and identify proteins.
- THz has been used in clinical diagnosis of pathogens including Coronaviruses.
- Platform of THz may be used as tool for disease control and public health.

Abstract: Terahertz (THz) spectroscopy is an emerging technology that is bringing a number of technical breakthroughs in several scientific applications. This review aimed to describe potential applications of THz spectroscopy at the biochemistry and molecules detection for food industry, environment monitoring and diagnostics, and present the importance of such technological platform in disease control and Public Health.

Keywords: diagnosis; terahertz; covid-19; pandemics; sars-cov-2; innovation; technology; public health; spectrometry; technological platform.

INTRODUCTION

One of most interesting areas for natural phenomenon exploration may be found at the spectral Terahertz (THz) region [1]. Recently, due to unique properties of THz emission, a series of techniques have been extensively used in a variety of application. Resonance of perceptible frequency (digital impressions or

signatures) of several sizes may be located at the THz frequency range, promising significative impact over different areas [2].

THz radiation is a frequency at the magnitude of 1 trillion oscillations per second. The correspondent wavelength is around few tenth of millimeter and is located at the spectrum of electromagnetic radiation between superior portion of micro-wave (wave length at millimeter range) and the inferior portion of infrared (wave length at hundredth of millimeter range) [3,4] This results in a series of optical or semi-optical proprieties (such as light) and ways of propagation/penetration near to other electromagnetic waves [5].

The THz radiation may naturally occur in our environment, as part of solar spectrum and by natural radiation at the terrestrial atmosphere. Despite such abundance, the non-ionizing character of this radiation and lack of THz practical emitters have left the biological meaning of this region of electromagnetic spectrum relatively unexplored for some time. Distinct proprieties, along with the development of new sources of THz and the broad spectrum of current application, have presented ideal conditions for the comprehension of interactions between THz radiation and biomolecules [6].

The electromagnetic spectrum region, with wave frequencies located between approximately 300 GHz and 10THz (Table 1), has an intriguing characteristic that semiconductors, such as transistors and lasers that generate radiation at frequencies above and below this range, respectively [7]. This range named by TeraHertz GAP range had considerable advances in the last decade in equipment development, which allowed to envision a wide field application.

Table 1. Comparison of electromagnetic wavelengths and radiation source

Electromagnetic Spectrum Region	Frequency Range (HZ)	Radiation Source
Radio Waves	$< 3,0 \times 10^9$	Electronic
Micro-waves	$3,0 \times 10^9$ a 300×10^9	
TeraHertz Gap	300×10^9 a 10×10^{12} or 300 GHz a 10 THz	Optoelectronic
Infrared	10×10^{12} a $4,3 \times 10^{14}$	Optical
Visible	$4,3 \times 10^{14}$ a $7,5 \times 10^{14}$	

The applications of TeraHertz technology large-scale have been restricted and represents a challenge to scientists [8]. THz optoelectronic techniques may be a necessary to THz components and systems due to potential of generation and detection of reasonable THz signals. Different optoelectronic tools may be contributed to optoelectronic compact THz systems development for THz imaging and spectroscopy with decreased size and price [9].

The usually THz radiation sources used comprise: a) harmonic multipliers of tunable microwave sources, b) vacuum electronics c) supercontinua generated by ultrafast lasers and photoconductive switches, and c) difference-frequency mixing of tunable continuous-wave lasers [8]. Recent studies have shown different sources to THz radiation, for example: a) air plasma [10]; b) spintronic next-generation ultra-wideband [11]; and c) Gas-phase molecular laser [8].

Different spectrometry techniques may acquire data from samples of different levels, leading to complex spectral data. Hidden information in such data may be used in a combination with algorithms of efficient modeling. The algorithm of modeling is a method of rapid development which may extract the information characteristics, classify, and characterize them in an efficient form. With the rapid development of algorithm, more studies focusing on the implementation of object detection, classification of images and other fields of computational vision [12].

Applications on food industry and environment

Due to described characteristics, identification of molecules through identification of THz waves has been shown to be innovative and promising, highly explored at the food industry, for example. Terahertz (THz) spectroscopy has been used to identify proteins in processed food, once heating may affect in extractability of proteins in molecular extraction techniques [13]. Terahertz absorption spectroscopy was successfully used in qualitative analysis to differentiate three isomers trehalose, a nonreducing sugar extensively of food industry [14].

One of first applications using THz spectrometry has happen in the identification of fecundated eggs immediately following chicken laying, due to its conformational alterations, allowing significative savings on industry costs [15]. Other potential use of THz spectrometry is the monitoring and quantification of carbohydrate molecules in plants by identifying a peak at the THz spectrum related to this carbohydrate. Transgenic rice seeds may be identified with an excellent assurance rate due to conformational alterations of their carbohydrate molecules [16]. In addition, THz may be capable to determine water status of plants under drought conditions [17].

Another application of THz methodology is the environmental control. Water and sewer are an important concern for public health. Several harmful microorganism may pollute different water sources and related species need a disinfectant able to remove them from the contaminated water. Some studies have shown the utilization of nanoparticles rich in magnesium or zinc with inhibitory effect in such microbiota. Same studies have indicated the possibility of identifying these nanoparticles in water, by THz radiation, applied to quality control [18]. In a recent study, THz has shown efficiency to measure several lipids synthesized by *Scenedesmus obliquus* microalgae, a renewable source of biodiesel [19].

Applications in Biomedicine and Diagnostics

The number of THz applications in biological and medical fields has significantly raised in recent years due to its unprecedented sensitivity to the content of water in animal tissues [20]. Experimental study has shown that THz irradiation may increase sperm motility associated to intracellular calcium concentration. This result highlights THz as a potential reproductive technology to improve *in vitro* sperm activity [21].

The first studies at the THz region about the contrast between healthy and sick tissues have focused on alterations related to such content (essential to healthy tissues) [22]. Measurements of water concentration in several samples applying THz have been already described, showing promising results with precise analysis of water contents [2].

Besides, this technique is non-invasive and totally harmless for living organisms, once THz has around three magnitude orders (less energy than necessary for ionization) which majority of spectroscopy sources in the time domain of THz [20].

However, not only water may cause the observed differences in refraction indexes. Molecular structural changes potentially present in sick tissue have been described and may affect the THz response. For example, methylated DNA, early found in cancer tissue, may give a distinct resonance in the THz reading [22]. For that reason, in biology and medicine, such sources of THz low frequency are widely applied for conformational investigations, molecular changes, chemical reaction, and many other applications [1].

The THz technology has significantly improved in recent years, in a way that THz image has become more accessible and easier to use, with a growing interest in biomedical applications [22]. In an experimental study, THz has been used to measure homocysteine, and has shown higher accuracy when compared to laser Raman spectrum for concentration detection, the reference method to determine pathological disease stage associated to homocysteine in human plasma and urine [23]. In addition, a recent study has endorsed the quantitative and real-time identification of homocysteine in human liquid by terahertz spectroscopy [24].

Oncological diagnosis

Cancer biomarkers have played a significative role in providing information for specific diagnosis. Particularly, carcinogenesis may cause chemical products and structural changes in cell DNA, and detection of such alterations would be important to identify tumors. Several research groups have characterized the spectral properties of DNA at the range of THz frequency [25]. In such way, regulation of genic expression may be closely related to carcinogenesis, reason of which, at the DNA evaluation, metilation may be a key factor on cancer research. Since there is a characteristic frequency of metilated DNA at THz region, radiation THz may play an important role on metilation activity for cancer therapy [26].

THz waves can directly detect changes on mutilated DNA because characteristic energies are on same frequency region. Besides, levels of THz energy are not high enough to damage DNA by ionization, as previously described [25]. These properties enable THz waves to be adequately use in non-invasive biomedical images for cancer diagnosis [3,4].

The THz imaging has been suggested for identification of skin burning and cancer. Studies have demonstrated influence of concentration and distribution of melanosomes and melanin on skin at the spectroscopic proprieties of THz [27].

THz technology has been rapidly developed and applied to “label-free” diagnosis of malignant diseases with different classifications and locations, in other words, detection without requirement of any compound or enzyme marker. They provide the capacity of detecting a tissue tumor in picoseconds, and the depth of probing in tissues is on microns, with spatial resolution in inferior scale than millimeters. Some studies have demonstrated such diagnostic methodology in glioma surgeries, pointing out the potential advantage of THz diagnosis on this type of cerebral intra-operative spectroscopy [28]. Based on Guidelines of the American Society for Radiation Oncology, an evaluation technique of efficient margin need not only to detect cancer at the surgical rim of tissue, but also detect wider margin width that may significantly reduce the recurrence risk. Images of THz spectral potence and tomographic images have shown a good qualitative comparison with pathological approach. Results have been successfully evaluated with pathology images, showing strong differentiation between carcinogenic and health tissues for all recently excised tissues [29,30].

Due to use of THz waves in intra-operative spectrometry, that is, directly on the patient tissue, concerns with biological safety and potential biological applications have been growing, as effects and influences of THz waves were not well established in living organisms [31]. THz waves can be easily absorbed by polar molecules, leading to tissue warmth and production of perceptible thermic effects [31]. However, THz spectroscopy may present high sensitivity to chemical changes in biological molecules, even without causing ionization and considerably minimizing this risk. In such scenario, cancer diagnosis by THz has been attracting high attention, particularly because the THz technique can distinguish the normal from abnormal tissues by spectroscopic images [3,32].

Bacteriological diagnosis

Fast diagnosis of bacterial infections remains a big challenge for medicine. Despite availability of antibiotics, bacterial infections have caused significant worldwide mortality. The main cause of mortality has been considered the late identification of infection source, which leads to inadequate medical treatment [33]. Majority of techniques for microbial detection has required pre-treatment such as fluorescence and culture processes. Thus, new tools for microorganism classification and identification, such as mold, yeast, and bacteria, with basis in their THz frequencies, have been developed and established [34].

THz signals with wavelength of approximately 300 μm (microns) provide a good balance between penetration, deepness and spatial resolution in biological applications, which can identify biological molecules such as water, CO_2 , glucose, yeast, proteins, oligonucleotides, viruses and bacteria [33].

Bacteria involved in infections can be identified due to changes in water content of infected tissues [22]. Moreover, charge transportation has been one of the most important phenomena which guarantee the function of biological systems. Extracellular filaments, part of several electrogenic bacteria, may be able to transmit electrons through surprising distances, and which can be identified by THz radiation [35].

Advanced medical tools for bacterial detection would easier the decision making on more individualized therapies, and the THz spectroscopy has recently shown itself as potential method for detection with advances related to characterization of bacterial components [33].

Virological diagnosis

Besides not invasive, the non-ionizing proprieties of THz radiation allow that the technique may be utilized as spectroscopy for even more complex structures. In protein, particularly, the conformational information plays an important role in the molecular interactions that can be analyzed by THz.

As candidate for a fast detection of biomaterials, the system of THz spectroscopy can be considered with an advantage due to its “label-free” diagnostic method. Since the protein spectrum is in the terahertz reading region, the most important conformational information in molecular interactions can be captured [36].

Due to the spatial position of THz range in the electromagnetic spectrum, THz waves are transitory and have high penetration, broadband, coherence and low energy, and can detect the majority of biomolecules such as DNA, RNA and other viral proteins [15].

Virus detection and identification have been of high interest due to their association with severe diseases. In last decades, several detection techniques of viruses including Polymerase Chain Reaction (PCR) and Reverse Transcription PCR (RT-PCR) for identification of DNA and RNA, respectively, have been developed and established. Despite historically very useful, these techniques have been considered fastidious and laborious, and new technologies may allow non-invasive, rapid, and sensitive detection [37].

The effect of THz radiation is specific of gene and exposition, and most likely, occurs at the level of transcription of DNA in RNA. In such context, by computer simulation, the modeling algorithm has shown that

prone of DNA promoter, at the transcription moment, is likely one of subjacent factors to the specific gene response to the conditions of applied irradiation [6].

Possibility of virus detection by THz has been demonstrated for causative agents of Influenza H1N1, H5N2 e H9N2, utilizing an experimental configuration of equipment. Another possibility is the detection of Zika virus by THz spectroscopy, also using experimental configuration of equipment. Spectroscopy of THz reflection can be used to detect designed viruses or aptamers designed for reaching the capsid proteins. Aptamers are designed oligonucleotides directed to bind to a specific molecule, tissue, biomarker, or pathogen [38,39].

Flu virus have been characterized by two types of carried surface antigens, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), such as H1N1, H5N2 and H9N2. HA is the main surface glycoprotein of influenza A virus, which of subtype H9N2 has been recognized as the most likely pandemic strain, crossing host species barrier and infecting swine and human beings. The THz spectroscopy has been applied to assess the formation of hydration layer around the protein HA of virus [40].

Despite the above reports, few THz studies to date have addressed the diagnosis of virus. Detection of these microorganisms can be a challenge because their frequencies and waves are smaller than the THz wavelength. However, by algorithms of modeling and metamaterials capable of manipulate electromagnetic waves, further studies may be promising [37].

Potential application on SARS-CoV-2 diagnosis

In addition to the other applications described herein, there is a possibility of applying THz diagnostic methodology, including its use in worldwide crise moments as the current pandemics. The COVID-19 may emphasize the importance of careful use of financial and human resources, which may be particularly crucial in Public Health. A good organization and preventive approach must be mandatory [41,42].

The initial cases of the COVID-19 occurred in Wuhan, province of Hubei, China, between December 2019 to January 2020. The World Health Organization (WHO) announced on January 31st the outbreak of COVID-19 in China as a public health emergency of international interest, which was characterized as pandemic on March 11th. The causative virus of COVID-19, SARS-CoV-2, was isolated in January 2020 and identified as a member of β -CoVs [42,43]. The USA has classified the pandemic as national emergency on March 14th, 2020. The virus fast spreading in China and Italy rapidly overcame hospitalization capacity. Due to the uncertainty on the number of SARS-CoV-2 infected persons, mostly asymptomatic, it is hard to evaluate the precision of projections generated by complex epidemiological models [42].

In Brazil, cases increase daily and state most affected is São Paulo, also the most populous. Until April 14, 2020, the mortality rate was 1.361/23.955 (5,68%) [44].

Non diagnosed COVID-19 cases have been a concern on the midst of pandemic and lack of supplies in quantity and quality for RT-PCR. In certain moments, due to shortage of products, pandemic could be monitored only by increase of pneumonia cases at the Intensive Care Units (UCI) at reference hospitals of affected cities [45]. Isolation of cases and tracking of recent contacts, which has been used to control outbreaks of infectious diseases for centuries, was also used at the COVID-19 pandemics. Transmission prior to symptoms onset only could be avoided by monitoring of previous contacts of confirmed cases by diagnostic tests. Infected persons without hospital attendance, likely due to subclinical infection, has been the biggest challenge of COVID-19 practically unstoppable spreading [46].

Studies have suggested that most patients may develop antibodies only at the second week following the initial clinical onset. Thus, COVID-19 diagnosis based on antibody detection by serology may be possible only on clinical recovery phase, sometimes to late for early clinical intervention or transmission interruption. At this point, based on available data to date, the WHO has not recommended the use of rapid serological tests on clinical practice, and encourage the continuing work to identify its usefulness in epidemiological surveillance studies [47].

A high precision diagnostic test for SARS-CoV-2 infection has been necessary to guide a fast action for auto-isolation and early clinical treatment. Testing would also guide decision making on recent contact tracking, therapies for COVID-19 or alternative treatment for negative results, and monitoring of impact of such interventions on public health and directing results of research, such as drug efficacy [48].

The COVID-19 has treated general population, despite asymptomatic cases, due to disease complications and death in some patients. Pneumonia associated to ventilator (PAV) has been a nosocomial infection occurring at the intensive care unit and its diagnostic pattern has been based in clinical criteria and bronchoalveolar lavage. Analysis of exhaled air has been a promising non-invasive method for rapid diagnosis of such pneumonias, as comprise exogen and endogen volatile organic contents (VOCs) which

can differentiate sick from health individuals. Captured VOCs in desorption tubes can be measured by gas chromatography and mass spectrometry [49,50].

As the symptoms and signals of COVID-19 have been similar to several other common febrile and respiratory diseases, patient surveillance and management rely on precise diagnostic tests [48]. Analysis of THz waves could be utilized on VOC measurements in SARS-CoV-2 infected patients, as the technique has been already used in other medical applications and diagnosis, as described above. Breathing could be easily and rapidly sampled with the necessary frequency, with a possible measurement, as previously indicated [49]. In the absence of potential successful interventions, a key metric for success of social distancing would be better for a effective epidemiological surveillance [51].

CONCLUSION

This review work, the most recent advances in research on THz technology and its applications were briefly presented, focusing on new studies related to diagnosis. There is a great effort by the international scientific community to better explore the potentialities of THz technology, generating innovations and applications practices. The promising future of THz technology involves great challenges, but the potential for generating knowledge, new products and applications is equally great. In addition, the introduction of THz technology as a diagnostic platform in research institutes can provide viable and rapid results for public health treatments, such as diagnosis of rare diseases, cancer, antibiotic resistant bacteria and many others. Finally, Research Institutes must establish THz spectrometry as technological platforms for the development of emergency solutions, providing solutions that would be crucial in pandemic situations.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Not applicable

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shumyatsky P, Alfano RR. Terahertz sources. *J Biomed Opt.* 2011;16(3):033001.
2. Borovkova M, Khodzitsky M, Demchenko P, Cherkasova O, Popov A, Meglinski I. Terahertz time-domain spectroscopy for non-invasive assessment of water content in biological samples. *Biomed Opt Express.* 2018;9(5):2266.
3. Yu C, Fan S, Sun Y, Pickwell-Macpherson E. The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis: A review of investigations to date. *Quant Imaging Med Surg.* 2012;2(1):33–45.
4. Rong L, Latychevskaia T, Chen C, Wang D, Yu Z, Zhou X, et al. Terahertz in-line digital holography of human hepatocellular carcinoma tissue. *Sci Rep.* 2015;5:1–6.
5. Dabouis V, Chancerelle Y, Crouzier D, Debouzy J. À la frontière onde-lumière Rappels : les interactions THz-matière. 2009;
6. Bock J, Fukuyo Y, Kang S, Lisa Phipps M, Alexandrov LB, Rasmussen KO, et al. Mammalian stem cells reprogramming in response to terahertz radiation. *PLoS One.* 2010;5(12):8–13.
7. Sirtori C. Applied physics: Bridge for the terahertz gap. *Nature.* 2002;417(6885):132–3.
8. Chevalier P, Amirzhan A, Wang F, Piccardo M, Johnson SG, Capasso F, et al. Widely tunable compact terahertz gas lasers. *Science (80-)* [Internet]. 2019 Nov 15;366(6467):856 LP – 860. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/366/6467/856.abstract>
9. Tunable resolution terahertz dual frequency comb spectrometer. *Opt Express* [Internet]. 2016;24(26):30100–7. Available from: <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-24-26-30100>
10. Feng S-J, Dong L-Q, Ma D, Wu T, Tan Y, Zhang L, et al. Excitation-wavelength-dependent THz wave modulation via external bias electric field. *Chinese Phys B.* 2020 Mar 31;29.
11. Xu Y, Zhang F, Zhang XQ, Du YC, Zhao HH, Nie TX, et al. Research advances in spintronic terahertz sources. *Wuli Xuebao/Acta Phys Sin.* 2020;69(20).
12. Zhang J, Yang Y, Feng X, Xu H, Chen J, He Y. Identification of Bacterial Blight Resistant Rice Seeds Using Terahertz Imaging and Hyperspectral Imaging Combined With Convolutional Neural Network. *Front Plant Sci* [Internet]. 2020 Jun 24;11:821. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32670316>
13. Xie L, Yao Y, Ying Y. The application of terahertz spectroscopy to protein detection: A review. *Appl Spectrosc Rev.* 2014;49(6):448–61.
14. Huang L, Li C, Li B, Liu M, Lian M, Yang S. Studies on qualitative and quantitative detection of trehalose purity by terahertz spectroscopy. *Food Sci Nutr.* 2020;8(4):1828–36.

15. Khaliduzzaman A, Konagaya K, Suzuki T, Kashimori A, Kondo N, Ogawa Y. A Nondestructive Eggshell Thickness Measurement Technique Using Terahertz Waves. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–5.
16. Zhang J, Yang Y, Feng X, Xu H, Chen J, He Y. Identification of Bacterial Blight Resistant Rice Seeds Using Terahertz Imaging and Hyperspectral Imaging Combined With Convolutional Neural Network. *Front Plant Sci*. 2020;11(June):1–15.
17. Browne M, Yardimci NT, Scoffoni C, Jarrahi M, Sack L. Prediction of leaf water potential and relative water content using terahertz radiation spectroscopy. *Plant direct* [Internet]. 2020 Apr 17;4(4):e00197–e00197. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32313868>
18. El Nahrawy AM, Hammad ABA, Bakr AM, Hemdan BA, Wassel AR. Decontamination of ubiquitous harmful microbial lineages in water using an innovative Zn₂Ti_{0.8}Fe_{0.2}O₄ nanostructure: dielectric and terahertz properties. *Heliyon* [Internet]. 2019;5(9):e02501. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02501>
19. Shao Y, Gu W, Qiu YA, Wang S, Peng Y, Zhu YM, et al. Lipids monitoring in *Scenedesmus obliquus* based on terahertz technology. *Biotechnol Biofuels*. 2020;13(1):1–11.
20. Hernandez-Cardoso GG, Rojas-Landeros SC, Alfaro-Gomez M, Hernandez-Serrano AI, Salas-Gutierrez I, Lemus-Bedolla E, et al. Terahertz imaging for early screening of diabetic foot syndrome: A proof of concept. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep42124>
21. Wei C, Zhang Y, Li R, Wang S, Wang T, Liu J, et al. Terahertz irradiation-induced motility enhancement and intracellular calcium elevation in human sperm in vitro. *Biomed Opt Express*. 2018;9(9):3998.
22. Sun Q, He Y, Liu K, Fan S, Parrott EPJ, Pickwell-MacPherson E. Recent advances in terahertz technology for biomedical applications. *Quant Imaging Med Surg*. 2017;7(3):345–55.
23. Li T, Ma H, Peng Y, Chen X, Zhu Z, Wu X, et al. Gaussian numerical analysis and terahertz spectroscopic measurement of homocysteine. *Biomed Opt Express* [Internet]. 2018 Oct 16;9(11):5467–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460140>
24. Wang L, Wu X, Peng Y, Yang Q, Chen X, Wu W, et al. Quantitative analysis of homocysteine in liquid by terahertz spectroscopy. *Biomed Opt Express* [Internet]. 2020 Apr 15;11(5):2570–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32499944>
25. Cheon H, Yang HJ, Lee SH, Kim YA, Son JH. Terahertz molecular resonance of cancer DNA. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(August):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep37103>
26. Cheon H, Paik JH, Choi M, Yang HJ, Son JH. Detection and manipulation of methylation in blood cancer DNA using terahertz radiation. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-42855-x>
27. Peralta XG, Lipscomb D, Wilmsink GJ, Echchgadda I. Terahertz spectroscopy of human skin tissue models with different melanin content. *Biomed Opt Express*. 2019;10(6):2942.
28. Gavdush AA, Chernomyrdin N V., Malakhov KM, Beshplav S-IT, Dolganova IN, Kosyrkova A V., et al. Terahertz spectroscopy of gelatin-embedded human brain gliomas of different grades: a road toward intraoperative THz diagnosis. *J Biomed Opt*. 2019;24(02):1.
29. Bowman T, Bailey K, El-shenawee M, Bowman T, Vohra N, Bailey K, et al. Terahertz tomographic imaging of freshly excised human breast tissues. *J Med Imaging*. 2019;6(02):1.
30. El-Shenawee M, Vohna N, Bowman T, Bailey K. Cancer detection in excised breast tumors using terahertz imaging and spectroscopy. *HHS Public Access. Biomed Spectrosc Imaging* . 2019;8(1-2):1-9.
31. Tan SZ, Tan PC, Luo LQ, Chi YL, Yang ZL, Zhao XL, et al. Exposure Effects of Terahertz Waves on Primary Neurons and Neuron-like Cells Under Nonthermal Conditions. *Biomed Environ Sci*. 2019;32(10):739–54.
32. Kistenev Y V., Borisov A V., Titarenko MA, Baydik OD, Shapovalov A V. Diagnosis of oral lichen planus from analysis of saliva samples using terahertz time-domain spectroscopy and chemometrics. *J Biomed Opt*. 2018;23(04):1.
33. Berrier A, Schaafsma MC, Nonglaton G, Bergquist J, Rivas JG. Selective detection of bacterial layers with terahertz plasmonic antennas. *Biomed Opt Express* [Internet]. 2012;3(11):2937–49. Available from: <http://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-3-11-2937>.
34. Yoon SA, Cha SH, Jun SW, Park SJ, Park J-Y, Lee S, et al. Identifying different types of microorganisms with terahertz spectroscopy. *Biomed Opt Express*. 2020;11(1):406.
35. Gagkaeva Z V., Zhukova ES, Grinenko V, Grebenko AK, Sidoruk K V., Voeikova TA, et al. Terahertz-infrared spectroscopy of *Shewanella oneidensis* MR-1 extracellular matrix. *J Biol Phys*. 2018;44(3):401–17.
36. Lee DK, Kang JH, Kwon J, Lee JS, Lee S, Woo DH, et al. Nano metamaterials for ultrasensitive Terahertz

- biosensing. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):5–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08508-7>
37. Park SJ, Cha SH, Shin GA, Ahn YH. Sensing viruses using terahertz nano-gap metamaterials. *Biomed Opt Express*. 2017;8(8):3551.
 38. Dolai S, Tabib-azar M. Terahertz Detection of Zika Viruses. Preprints [Internet]. 2020;(February). Available from: https://www.researchgate.net/publication/339332873_Terahertz_Detection_of_Zika_Viruses
 39. Keshavarz A, Vafapour Z. Sensing avian influenza viruses using terahertz metamaterial reflector. *IEEE Sens J*. 2019;19(13):5161–6.
 40. Sun Y, Zhong J, Zhang C, Zuo J, Pickwell-MacPherson E. Label-free detection and characterization of the binding of hemagglutinin protein and broadly neutralizing monoclonal antibodies using terahertz spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2015;20(3):037006.
 41. Coccolini F, Perrone G, Chiarugi M, Di Marzo F, Ansaloni L, Scandroglio I, et al. Surgery in COVID-19 patients: Operational directives. *World J Emerg Surg*. 2020;15(1):1–7.
 42. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199–207.
 43. Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfus Med Rev* [Internet]. 2020;34(2):75–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796320300146>
 44. Marson FAL, Ortega MM. COVID-19 in Brazil. *Pulmonology*. 2020;26(4):241–4.
 45. Cimerman S, Chebabo A, Cunha CA da, Rodríguez-Morales AJ. Deep impact of COVID-19 in the healthcare of Latin America: the case of Brazil. *Braz. J. Infect. Dis*. 2020;24(2):93–5.
 46. Hellewell J, Abbott S, Gimma A, Bosse NI, Jarvis CI, Russell TW, et al. Feasibility of controlling COVID-19 outbreaks by isolation of cases and contacts. *Lancet Glob Heal*. 2020;8(4):e488–96.
 47. Kfourri R. Testes sorológicos para COVID-19 : Interpretação e aplicações práticas. 2020;(July).
 48. Coronavirus (COVID-19) events as they happen [Internet]. [cited 2020 Dec 6]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>
 49. Rothbart N, Holz O, Koczulla R, Schmalz K, Hübers HW. Analysis of human breath by millimeter-wave/terahertz spectroscopy. *Sensors (Switzerland)*. 2019;19(12):1–12.
 50. van Oort PMP, Nijssen T, Weda H, Knobel H, Dark P, Felton T, et al. BreathDx - molecular analysis of exhaled breath as a diagnostic test for ventilator-associated pneumonia: Protocol for a European multicentre observational study. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2017;17(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12890-016-0353-7>
 51. Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, Lipsitch M. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science* (80-) [Internet]. 2020 May 22;368(6493):860 LP – 868. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/368/6493/860.abstract>



© 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).