



**MARCELA DE SOUZA PEREIRA**

**EQUIPAMENTOS DE BAIXO CUSTO PARA CONTROLE DE  
QUALIDADE DE BIOINSUMOS PRODUZIDOS  
*ON FARM***

**LAVRAS – MG  
2023**

**MARCELA DE SOUZA PEREIRA**

**EQUIPAMENTOS DE BAIXO CUSTO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE  
BIOINSUMOS PRODUZIDOS *ON FARM***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. PhD. Teotonio Soares de Carvalho  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Marcela de Souza.

Equipamentos de baixo custo para controle de qualidade de  
bioinsumos produzidos *on farm* / Marcela de Souza Pereira. - 2023.  
71 p. : il.

Orientador(a): Teotonio Soares de Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Bioinsumos. 2. Ciência Aberta. 3. BOX-PCR. I. Carvalho,  
Teotonio Soares de. II. Título.

**MARCELA DE SOUZA PEREIRA**

**EQUIPAMENTOS DE BAIXO CUSTO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE  
BIOINSUMOS PRODUZIDOS *ON FARM***

**LOW-COST EQUIPMENT FOR *ON FARM* QUALITY CONTROL OF BIOINPUTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de outubro de 2023.

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

UFLA

Dr. Ederson da Conceição Jesus

EMBRAPA

Prof. PhD. Teotonio Soares de Carvalho  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2023**

Dedico à minha família, em especial,  
Maria Helena de Carvalho (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida em todos os momentos, me guiando e iluminando. Obrigada por fortalecer diariamente a minha fé, por me conceder oportunidades excelentes, por sua bondade, por me amar e por me ajudar em todos os obstáculos ao longo da minha trajetória.

Aos meus pais, Rita e Luiz, pelo amor, carinho, cuidado, confiança, apoio e incentivo, que me permitiram chegar até aqui e por todo o apoio incondicional, por me mostrarem sempre do que sou capaz e me darem forças diariamente para continuar este trabalho.

À minha irmã, Camila, pelo amor, carinho, confiança, cumplicidade e conselhos, e por todos os momentos de distrações, que sempre me alegraram, e ao meu cunhado, Bruno, por todos os conselhos, pela confiança, pelo incentivo e por todo o cuidado que sempre teve comigo.

Aos meus sobrinhos, Ravi e Liz, por me mostrarem o verdadeiro significado do que é o amor. Por sempre me arrancarem os melhores sorrisos e por trazerem leveza para os meus dias.

Ao meu orientador, Teotonio, por todo conhecimento compartilhado. Por acreditar no meu potencial, pela confiança em mim e por me ajudar prontamente todas as vezes em que precisei. Por me fazer sair da minha zona de conforto na pesquisa. Sem a sua orientação, nada disso seria possível.

À Professora Fatima, pelos ensinamentos, pela confiança, pelos anos de colaboração em meus trabalhos e por ser uma pessoa a qual tenho muita admiração.

Às minhas amigas, Nívia e Delane, por sempre estarem presentes em minha vida, por todos os momentos que passamos juntas, pela cumplicidade, conexão, amizade e apoio. Aos meus amigos de longa data, Mylena e Celso, por sempre estarem presentes e se fazerem presentes, mesmo com a distância. Às minhas amigas de mestrado, Marcela, Mikaella e Layane, por todo o apoio, amizade e momentos vividos, e aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia, em especial, Ana Lucía, Amanda, Dani, Sílvia e Márcia.

À IQualis pelo apoio e suporte durante a realização deste projeto.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciência do Solo (DCS) e aos professores que o integram, por toda ajuda e conhecimento partilhado ao longo dessa jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Não se preocupe com a distância entre seus sonhos e a realidade. Se você pode sonhá-los, você pode realizá-los.

**(Belva Davis)**

## RESUMO

Bioinsumos são produtos biológicos capazes de proporcionar melhor crescimento, desenvolvimento e mecanismos de respostas no metabolismo de plantas. Sua utilização não apenas visa reduzir os impactos econômicos, mas também busca mitigar os efeitos ambientais associados à prática agrícola. Quando baseados em microrganismos, esses bioinsumos podem ser produzidos por empresas especializadas, seguindo rigorosos padrões de qualidade, ou alternativamente, através da produção local em propriedades rurais, processo conhecido como produção de bioinsumos “*on farm*”. Entretanto, essa produção é heterogênea, incluindo desde instalações altamente tecnificadas até sistemas rudimentares e improvisados que utilizam recursos como tambores e caixas plásticas, devido aos elevados custos associados aos biorreatores comerciais. Outro gargalo da produção de bioinsumos “*on farm*” é a avaliação da qualidade desses bioinsumos que, quando efetuada, é frequentemente limitada a técnicas fenotípicas pouco precisas, especialmente para procariotos. A utilização de técnicas baseadas em DNA, por outro lado, pode ser bastante oportuna para o controle de qualidade dos bioinsumos devido à sua precisão, porém, os equipamentos necessários para executar essas análises possuem alto custo. Neste trabalho, investigamos a viabilidade da aplicação de princípios da Ciência Aberta para o desenvolvimento de equipamentos de baixo custo e acesso livre capazes de replicar as funcionalidades de equipamentos comerciais, como uma forma de facilitar a utilização de métodos moleculares para controle de qualidade de bioinsumos. Isso inclui o desenvolvimento da instrumentação necessária para realizar a extração de DNA, a amplificação de fragmentos de DNA por PCR (termociclador) e análise de bandas por eletroforese em gel de agarose (fonte e cuba de eletrofore), por meio da utilização de microcontroladores, componentes eletrônicos de custo reduzido e peças fabricadas por impressão 3D. Utilizando bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas para prova de conceito, nós desenvolvemos uma metodologia de baixo custo que permitiram a execução da análise de *barcode* com BOX-PCR para distinguir diferentes estirpes, espécies e gêneros de bactérias. Para o termociclador aqui desenvolvido, o sistema de controle de temperatura adotado apresentou boa estabilidade e erro médio absoluto de 0,015°C. Esse equipamento foi capaz de amplificar com êxito os fragmentos de DNA por meio do BOX-PCR. Para a cuba e fonte de eletroforese em gel, houve a correta discriminação dos perfis de bandas, resultando em perfis distintos para os diferentes isolados. Embora necessite de adaptações para tornar os equipamentos mais amigáveis para os usuários, nós demonstramos uma abordagem viável para que essas técnicas moleculares sejam acessíveis a pequenos laboratórios. O projeto está disponível gratuitamente com licença aberta para que a comunidade usuária faça as adaptações necessárias.

**Palavras-chave:** Produtos biológicos. BOX-PCR. Ciência aberta. Rizóbios.



## ABSTRACT

Bioinputs are biological products capable of promoting enhanced growth, development, and response mechanisms in the metabolism of plants. Their use not only aims to reduce economic impacts but also seeks to mitigate the environmental effects associated with agricultural practices. When based on microorganisms, these bioinputs can be produced by specialized companies following rigorous quality standards, or alternatively, through local production on rural properties, a process known as "on-farm" bioinput production. However, this production is heterogeneous, ranging from highly technified facilities to rudimentary and improvised systems using resources such as drums and plastic boxes, due to the high costs associated with commercial bioreactors. Another bottleneck in "on-farm" bioinput production is the assessment of the quality of these bioinputs, which, when conducted, is often limited to imprecise phenotypic techniques, especially for prokaryotes. The use of DNA-based techniques, on the other hand, can be quite opportune for quality control of bioinputs due to their precision; however, the equipment needed to perform these analyses is costly. In this work, we investigated the feasibility of applying Open Science principles to the development of low-cost and open-access equipment capable of replicating the functionalities of commercial equipment as a way to facilitate the use of molecular methods for bioinput quality control. This includes the development of the necessary instrumentation to perform DNA extraction, DNA fragment amplification by PCR (thermocycler), and band analysis by agarose gel electrophoresis (electrophoresis power supply and gel box) using microcontrollers, low-cost electronic components, and 3D-printed parts. Using nitrogen-fixing nodular bacteria in legumes as a proof of concept, we developed a low-cost methodology that allowed the execution of barcode analysis with BOX-PCR to distinguish different strains, species, and genera of bacteria. For the thermocycler developed here, the adopted temperature control system showed good stability and an average absolute error of 0.015°C. This equipment successfully amplified DNA fragments through BOX-PCR. For the gel electrophoresis power supply and gel box, there was correct discrimination of band profiles, resulting in distinct profiles for different isolates. Although adaptations are needed to make the equipment more user-friendly, we demonstrated a viable approach for making these molecular techniques accessible to small laboratories. The project is freely available with an open license for the user community to make necessary adaptations.

**Keywords:** Biological products. BOX-PCR. Open science. Rhizobia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Recursos abertos da Ciência Aberta. UNESCO, 2021. ....	22
<b>Figura 2:</b> Valores e Princípios da Ciência Aberta. UNESCO, 2021. ....	23
<b>Figura 3:</b> Esquema do circuito eletrônico utilizado para monitoramento de temperaturas através de um termistor (TH1). Um diodo zener (Z1) foi utilizado para estabilizar a tensão de entrada em 2,7V no divisor de tensão formado por um resistor (R2) ligado em série com o termistor (TH1). A saída do divisor de tensão foi ligada à porta analógica A6 do Arduino para leitura da tensão, que é convertida para uma escala digital variando entre 0 (para tensão mínima) e 1023 (para a tensão máxima de referência). ....	29
<b>Figura 4:</b> Representação em 3D do braço robótico usado para transferir as amostras entre os recipientes. As movimentações vertical e horizontal são feitas por servomotores (SG90S) controlados por uma placa Arduino Nano (não representada na figura). Todas as peças, exceto o suporte para microtubos, foram impressas com filamento ABS. O suporte para microtubos foi impresso em resina e projetado para que os fundos dos microtubos converjam para a mesma posição, minimizando o potencial do efeito de qualquer heterogeneidade na distribuição da temperatura dentro dos recipientes de aquecimento. Dimensões exatas desse modelo podem ser encontradas nos arquivos disponíveis no repositório do GitHub desse projeto. ....	32
<b>Figura 5:</b> Representação do duty-cycle e sua relação com a potência. Do autor, 2023. ....	34
<b>Figura 6:</b> Etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no termociclador de baixo custo. Do autor, 2023. ....	36
<b>Figura 7:</b> Representação em 3D mostrando uma visão parcial da cuba de eletroforese desenvolvida neste trabalho. O gel de agarose fica disposto sobre um suporte cuja base isola eletricamente os dois lados da cuba, forçando a corrente elétrica a passar exclusivamente através do gel. Um tampão TAE (não representado na figura) é adicionado em quantidade suficiente para cobrir ligeiramente o gel. O campo elétrico é formado a partir da aplicação de uma tensão negativa no eletrodo localizado acima dos poços no gel (à direita na imagem) e de uma tensão positiva no eletrodo localizado no lado contrário aos poços (à esquerda na imagem), de tal modo a induzir a migração do DNA e a separação de bandas por tamanho na direção do eletrodo negativo para o positivo. Dimensões exatas desse modelo podem ser encontradas nos arquivos disponíveis no repositório do GitHub desse projeto. ....	40

<b>Figura 8:</b> Modelo para impressão 3D do molde e pente necessários para confecção do gel de agarose. Arquivo original disponível no repositório do GitHub desse projeto.....	41
<b>Figura 9:</b> Curva de calibração do termômetro digital. Os quadrados pretos representam os dados usados na calibração, enquanto os pontos vermelhos indicam os dados usados na validação do instrumento. A curva foi ajustada através de polinômios de terceira ordem aplicados a cada um dos quatro segmentos (I-IV) indicados na figura. O eixo horizontal representa a leitura no conversor analógico-digital (ADC) do Arduino, que varia numa escala de 0 a 1023. O eixo horizontal representa o valor da temperatura no bloco do termociclador comercial usado para calibração. ....	43
<b>Figura 10:</b> Calibração das temperaturas para as diferentes etapas do BOX-PCR com diferentes valores de Kp e Ki. ....	45
<b>Figura 11:</b> Curva de temperatura do BOX-PCR em 10 ciclos. ....	47
<b>Figura 12:</b> Perfil de bandas por eletroforese em gel de agarose das amostras de PCR do termociclador convencional e do de baixo custo entre diferentes gêneros. Os números 1 e 2 indicam os marcadores de 1 kb e 100 bp, respectivamente. As siglas Be <sup>1</sup> e Be <sup>2</sup> são das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, respectivamente. As siglas M e Ad são das estirpes UFLA 01-765 e UFLA 1-100, respectivamente.....	49
<b>Figura 13:</b> Separação de bandas por eletroforese em gel de agarose no equipamento de baixo custo. Os números 1 e 2 indicam os marcadores de 1kb e 100 bp, respectivamente. As siglas Be <sup>1</sup> e Be <sup>2</sup> são das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, respectivamente. As siglas Bj, Bb, M e Ad são das estirpes UFLA 06-37, UFLA 3-321, UFLA 01-765 e UFLA 1-100, respectivamente. ....	51
<b>Figura 14:</b> Separação de bandas por eletroforese em gel de agarose no equipamento convencional. Os números 1 e 2 indicam os marcadores de 1kb e 100 bp, respectivamente. As siglas Be <sup>1</sup> e Be <sup>2</sup> são das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, respectivamente. As siglas Bj, Bb, M e Ad são das estirpes UFLA 06-37, UFLA 3-321, UFLA 01-765 e UFLA 1-100, respectivamente. ....	52
<b>Figura 15:</b> Custos dos componentes dos equipamentos de baixo custo desenvolvidos. ....	55
<b>Figura 16:</b> Esquema do protocolo inicial para análises de bioinsumos. Do autor, 2023. ....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estirpes utilizadas e sua origem.....	37
--	----

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	6
RESUMO .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Objetivo.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 Bioinsumos e Produção “on farm” .....	16
2.2 Controle de qualidade de bioinsumos produzidos “on farm” e Técnicas Moleculares ..	17
2.3 Ciência Aberta .....	20
2.4 Hardware Abertos aplicados a Técnicas Moleculares .....	24
2.5 Hardware Abertos aplicados a Técnicas Moleculares na Agricultura .....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1 Desenvolvimento de termômetros digitais para o monitoramento/controle de temperatura .....	28
3.2 Conceito geral do termociclador .....	30
3.3 Controle de Temperatura .....	33
3.4 Avaliação da ciclagem das temperaturas .....	35
3.5 Origem das estirpes .....	36
3.6 Crescimento das bactérias e extração do DNA bacteriano .....	38
3.7 Amplificação do DNA bacteriano via BOX-PCR .....	38
3.8 Fonte e cuba para eletroforese em gel de agarose.....	39
3.9 Confeção do gel e separação das bandas dos fragmentos amplificados por BOX-PCR .....	41
3.10 Disponibilidade do projeto.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1 Termômetro digital .....	42
4.2 Termociclador .....	43

4.2.1 Seleção de parâmetros para o controlador PI.....	43
4.2.2 Capacidade de ciclagem das temperaturas do termociclador.....	46
4.2.3 Amplificação de fragmentos de DNA por BOX-PCR no termociclador de baixo custo.....	47
4.3 Separação de bandas oriundas do BOX-PCR na cuba e fonte de eletroforese .... de baixo custo .....	50
4.4 Imageamento de géis de agarose.....	53
4.5 Custos dos equipamentos.....	54
5. PROPOSTA DE PROTOCOLO INICIAL PARA ANÁLISE DE BIOINSUMOS POR BOX-PCR.....	55
6. DESAFIOS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	58
REFERÊNCIAS .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da participação de processos biológicos na agricultura é uma importante alternativa à utilização de insumos químicos sintéticos, reduzindo os impactos econômicos e ambientais da agricultura (Timmusk *et al.*, 2017). Um exemplo dessa abordagem é utilização de bioinsumos, que são produtos de origem vegetal, animal ou microbiana que interferem de forma positiva no desenvolvimento e produção agropecuária, em sistemas aquáticos e florestais (MAPA, 2020).

Exemplos de bioinsumos utilizados na agricultura incluem aqueles formulados à base de microrganismos, como bactérias e fungos, macrorganismos, como predadores e parasitóides, semioquímicos como feromônios ou então a base de bioquímicos como hormônios (Vidal *et al.*, 2020). Esses insumos, além de contribuir para uma produção agrícola sustentável, dinâmica e competitiva, são capazes de reduzir os custos de produção, dado que tais produtos são geralmente mais baratos que insumos químicos sintéticos, a depender de como são produzidos.

Dada a necessidade de uma agricultura mais sustentável associado à pressão econômica sobre os produtores rurais, a fim de reduzir os custos de produção, tem-se notado um crescimento expressivo no mercado de bioinsumos nos últimos anos (Vidal *et al.*, 2020). Para o Brasil, é estimado que esse setor movimente aproximadamente R\$1,0 bilhão por ano e cresça a uma taxa anual superior a 10% (Dall’agnol; Nogueira, 2020).

Os bioinsumos de maior impacto econômico na agricultura brasileira são aqueles formulados com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* para aplicação na soja. Essas bactérias são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e transformá-lo em nitrogênio na forma amoniacal, forma essa absorvida pelas plantas (Moreira; Siqueira, 2006). Em adição à redução dos impactos ambientais, essa biotecnologia reduz drasticamente os custos financeiros de produção da soja, visto que o custo do inoculante é muito inferior ao do fertilizante nitrogenado mineral que seria requerido pela cultura na ausência dessas bactérias. Cerca de 30 bilhões de reais são economizados anualmente pela substituição de fertilizantes químicos por inoculantes com rizóbios (Dall’agnol; Nogueira, 2020).

Esses bioinsumos podem ser fabricados por empresas especializadas, sob alto controle de qualidade para assegurar e atender a legislação vigente (Brasil, 2011) quanto aos requisitos de alta concentração celular do organismo-alvo, ausência/baixa concentração de contaminantes e longa viabilidade das células. Alternativamente, a produção de bioinsumos pode se dar pela multiplicação do microrganismo em propriedades rurais,

processo conhecido como produção “*on farm*”, que já possui um projeto de lei em tramitação (Brasil, 2020). A produção “*on farm*” é bastante heterogênea, com grande variação nos tipos de instalações, desde as mais tecnificadas até sistemas muito rudimentares, com fermentadores improvisados, tanques de água e/ou em tanques abertos, devido ao alto custo de biorreatores.

Em sistemas não axênicos, produtos ineficientes, ineficazes e contaminados podem ser encontrados (Santos, 2020). Mesmo em sistemas de produção “*on farm*” mais tecnificados, a falta de métodos precisos para o controle de qualidade ainda é um importante gargalo que limita a efetividade desse método de produção (Meyer *et al.*, 2022).

No que se diz respeito às tecnologias disponíveis para o controle de qualidade de bioinsumos à base de bactérias, métodos baseados em características fenotípicas como a contagem em placas e a morfologia de colônias são extremamente limitados e deficientes em termos de diferenciação entre o organismo alvo e eventuais contaminantes. Por outro lado, as técnicas moleculares, baseadas em DNA, são mais adequadas para identificação, tipagem e classificação de microrganismos (Guimarães *et al.*, 2012). Assim, essas técnicas têm grande potencial de serem incluídas em protocolos de controle de qualidade de bioinsumos.

Dentre as técnicas moleculares, o sequenciamento genético (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977) ganha destaque devido à sua boa detecção da variação genética entre os organismos (Callahan *et al.*, 2019). Essa técnica permite a realização de uma análise comparativa da sequência de genes altamente conservados, codificadores de importantes estruturas como o RNA ribossomal (rRNA), como o gene *16S rRNA*. No entanto, entraves como alto custo e baixa resolução taxonômica na distinção de espécies dentro de gêneros são observadas (Pérez-Corbas; Gomez-Valero; Buchrieser, 2020).

Outra possível abordagem seria a utilização dos genes *housekeeping*, que são genes necessários na manutenção de funções básicas das células e utilizados como referências de expressão gênica (Houkpe *et al.*, 2021). Porém, essa técnica é inviável para o controle de qualidade de rotina dado a necessidade de amplificação e sequenciamento de muitos genes.

Já a utilização de tipagem molecular por “*barcode*”, a exemplo da técnica de BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1994), apresenta características interessantes para aplicação como análise de rotina para o controle de qualidade de bioinsumos produzidos “*on farm*” devido ao custo relativamente mais baixo que o do sequenciamento, maior praticidade de execução e alta capacidade de discriminação de isolados, até dentro da mesma espécie (Borba *et al.*, 2020; Chibeba *et al.*, 2020; Zuluaga *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2017; Michel *et al.*, 2017;

Guimarães *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2008; Stocco *et al.*, 2008). Essa técnica é baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) e utiliza primers direcionados a regiões repetitivas do genoma, resultando em produtos amplificados com comprimento variáveis, que formam padrões de bandas em gel de eletroforese específicos para cada organismo (Rademaker *et al.*, 1997; Versalovic *et al.*, 1994). Apesar de seu menor custo quando comparada a técnicas baseadas em sequenciamento, a instrumentação necessária para a realização dessa técnica ainda é proibitiva para aplicação em pequenos laboratórios e/ou propriedades rurais de pequeno e médio porte.

Uma forma de tornar mais acessíveis essas tecnologias para o controle de qualidade da produção "*on farm*" é através do desenvolvimento de equipamentos de baixo custo e de acesso livre, em consonância com a recente tendência de Ciência Aberta. Essa tendência tem o objetivo de disponibilizar publicamente o conhecimento científico, de modo que seja acessível e reutilizável por todos os atores da sociedade. Além disso, a Ciência Aberta estimula o aumento nas contribuições e colaborações científicas, visto que diferentes usuários podem projetar e disponibilizar de forma gratuita projetos de equipamentos que são capazes de replicar a funcionalidade de equipamentos de alto custo comumente utilizados nos laboratórios (UNESCO, 2020; Martinez, 2018; Baden *et. al.*, 2015). A Ciência Aberta tem tido bastante destaque especialmente em função do aumento da disponibilidade de microcontroladores de baixo custo (Arduino, ESP32, Raspberry Pi, entre outros), de plataformas simples e gratuitas para sua programação (e.g. Arduino IDE, PlatformIO), e da redução de custos associados à impressão 3D, que simplifica bastante a prototipagem de equipamentos.

O desenvolvimento da instrumentação necessária para realizar a extração de DNA, amplificação de fragmentos de DNA por PCR e análise de bandas por eletroforese em gel de agarose utilizando componentes acessíveis pode viabilizar a aplicação de técnicas moleculares em pequenos laboratórios, até mesmo para aqueles localizados nas propriedades rurais. Dessa forma, essas técnicas podem ser incorporadas no controle de rotina da qualidade dos bioinsumos produzidos "*on farm*", apresentando custo reduzido e tempo de resposta ágil, permitindo rápidos ajustes na produção desses insumos para otimizar sua qualidade. Essa abordagem não apenas pode beneficiar os agricultores, mas pode também contribuir para um sistema agrícola mais sustentável e alinhado aos princípios da ecologia e da eficiência econômica.



## 1.1 Objetivo

O objetivo do presente estudo consistiu no desenvolvimento, teste e subsequente disponibilização, sob licença aberta em uma plataforma pública e gratuita, da instrumentação necessária para a realização da análise de BOX-PCR, visando sua aplicação no controle de qualidade de bioinsumos produzidos “*on farm*”. Para prova de conceito da viabilidade dessa abordagem, utilizou-se como organismos-alvos estirpes de diferentes gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas de leguminosas, algumas das quais aprovadas como inoculante para a cultura da soja pelo MAPA.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Bioinsumos e Produção “*on farm*”

De acordo com o Programa Nacional de Bioinsumos, segundo o Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020,

Bioinsumo é todo produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos (Brasil, 2020).

Os bioinsumos podem substituir total ou parcialmente a utilização de insumos agrícolas sintéticos, permitindo a redução dos custos ambientais e econômicos da agricultura (Timmusk *et al.*, 2017).

Um dos maiores exemplos de sucesso de bioinsumos no Brasil é o uso de inoculantes com *Bradyrhizobium* spp. no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura da soja, resultando em uma economia anual estimada em cerca de 38 bilhões de reais por safra devido à sua capacidade de substituir fertilizantes nitrogenados (EMBRAPA, 2023). Isso porque todo o nitrogênio necessário para a cultura da soja é fornecido através da FBN, processo natural realizado por bactérias que possuem a enzima nitrogenase, sendo capaz de reduzir o N<sub>2</sub> atmosférico para NH<sub>3</sub> (Moreira; Siqueira, 2006).

Apesar do grande sucesso da utilização da FBN em soja, o mesmo não ocorre para outras espécies leguminosas, seja para a produção de grãos, para a prática de adubação verde ou para a utilização em espécies florestais, apesar do fato de que múltiplas bactérias

comprovadamente eficientes e aprovadas como inoculantes para essas leguminosas estejam disponíveis (Brasil, 2011). A falta de disponibilidade de inoculantes no mercado para culturas de menor expressão econômica é nitidamente perceptível, o que está relacionada à baixa e difusa demanda pelos produtores que, por muitas vezes, desconhecem a técnica da FBN, ocasionando o baixo interesse da produção desses inoculantes por indústrias especializadas (Moreira; Souza, 2011).

Dessa forma, uma alternativa para a quebra do ciclo vicioso de baixa oferta e baixa demanda de inoculantes para outras espécies leguminosas é a produção desses inoculantes na própria fazenda, conhecida como produção de bioinsumos “*on farm*”, através da replicação de produtos comerciais oriundos do mercado, por meio de pré-inóculos comercializados por empresas especializadas (EMBRAPA, 2021). Esse tipo de produção pode ser realizada por meio de uma infraestrutura mais tecnificada e com alto grau de investimento (com biorreatores de grande porte em aço inoxidável, por exemplo) ou em estruturas mais simples e rudimentares (e.g. caixas d’água, tambores plásticos), sendo essa última mais comum entre pequenos e médios produtores, mas também presente em grandes propriedades. Essa heterogeneidade de condições de produção e a falta de controle de qualidade em ambas as situações podem resultar em produtos contaminados, ineficientes e com problemas relacionados à concentração de células viáveis e seu tempo de prateleira (Bocatti *et al.*, 2022; Meyer *et al.*, 2022).

## **2.2 Controle de qualidade de bioinsumos produzidos “*on farm*” e Técnicas Moleculares**

Um dos grandes gargalos da produção de bioinsumos “*on farm*” é o acesso a tecnologias para o controle de qualidade (Meyer *et al.*, 2022). Além da possível produção “*on farm*” de bioinsumos ineficazes e ineficientes, há ainda uma preocupação acerca da produção e utilização desses bioinsumos uma vez que a manipulação inadequada pode acarretar em problemas sanitários e ambientais, como a introdução de patógenos de plantas e animais, patógenos capazes de causar infecções em humanos, assim como a contaminação do solo e de recursos d’água (Brasil, 2020).

Atualmente, a ferramenta mais acessível e de maior disponibilidade é a contagem de células de unidades formadoras de colônias (UFC), baseada na morfologia de colônias para determinar possíveis contaminações (Brasil, 2011). Entretanto, a utilização dessa

técnica fenotípica é muito limitada dado que bactérias de grupos taxonômicos distintos podem compartilhar características morfológicas similares, dificultando a detecção de possíveis contaminantes (Barbosa *et al.*, 2017). Alternativamente, as ferramentas moleculares baseadas no genótipo dos microrganismos são as mais precisas para a discriminação de bactérias, sendo estas técnicas as mais adequadas para este tipo de avaliação (Getahun *et al.*, 2020; Guimarães *et al.*, 2012).

Dentre as diversas técnicas moleculares utilizadas, a filogenia molecular baseada em fragmentos do gene *16S rRNA* (Woese; Fox, 1977) é a mais amplamente utilizada (Callahan *et al.*, 2019) e é frequentemente baseada no sequenciamento de fragmentos de genes marcadores moleculares amplificados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Concebida inicialmente por Kary Mullis em 1983 (Mullis; Faloona, 1983), e descrita e apresentada para a comunidade científica em 1985 (Saiki *et al.*, 1985), essa técnica veio para transformar e revolucionar de maneira significativa a pesquisa nos campos da biologia e da genética (Zhu *et al.*, 2020).

Isso porque a técnica da PCR (Saiki *et al.*, 1985) é utilizada para amplificar fragmentos específicos de DNA *in vitro*, gerando bilhões de cópias do DNA em estudo em poucas horas. Para isso, uma pequena quantidade de DNA é adicionada em uma solução que possui os componentes essenciais para que a reação ocorra, como DNA polimerase, primers, nucleotídeos e sais. As amostras são submetidas a ciclos de aquecimento e resfriamento em um termociclador, promovendo a amplificação dos fragmentos de interesse. O processo da PCR compreende três fases distintas: a desnaturação, na qual ocorre a separação da dupla hélice, resultando em duas fitas de DNA isoladas; o anelamento, etapa em que os primers se ligam em regiões específicas do DNA; e por fim, a extensão, momento em que a enzima DNA polimerase sintetiza uma nova cadeia de DNA, utilizando os primers como pontos de partida. Posteriormente, já com o gene de interesse amplificado, é possível realizar o sequenciamento pelo método de Sanger (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977), um dos métodos mais usados para sequenciamento de produtos de PCR a partir de isolados microbianos. Entretanto, essa técnica possui desvantagens como o custo relativamente elevado por amostra, o tempo necessário para amplificar e sequenciar os produtos da PCR, a necessidade de conhecimento sobre bioinformática para as análises de filogenia molecular e determinação da taxonomia, e sobretudo, a limitação na separação de algumas espécies, a exemplo do gênero *Bradyrhizobium* (Guimarães *et al.*, 2012).

Uma forma para contornar a falta de resolução filogenética do gene *16S rRNA* é a utilização de outros marcadores moleculares, a exemplo dos genes *housekeeping*, genes

necessários para a manutenção das funções básicas das células (Hounkpe *et al.*, 2021). Porém, a aplicação desses genes em controle de qualidade de rotina é impraticável, haja vista a necessidade de amplificação e sequenciamento de vários genes, além da necessidade de otimização das condições da PCR para cada gene/organismos alvos.

Uma ferramenta alternativa para a identificação de microrganismos a partir do genótipo são as técnicas de “barcode”, como o BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1994). O BOX-PCR baseia-se na amplificação por PCR de sequências de DNA cujos comprimentos são variáveis em função da presença de elementos de DNA repetitivos e altamente conservados, presentes no genoma de diversas espécies bacterianas. O elemento BOX possui sequências repetitivas de 154 pares de bases (bp) que são organizadas em três subunidades altamente conservadas: boxA (59 bp), boxB (45 bp) e boxC (50 bp) (Versalovic *et al.*, 1994).

Após a amplificação dos fragmentos de DNA por BOX-PCR, os produtos resultantes são separados por eletroforese em gel de agarose. Nessa técnica, um campo elétrico de direção única é aplicado, sendo o movimento dos fragmentos determinado pelo peso molecular (Acanto; Castor; Langcoy, 2021). Assim, as moléculas de DNA, que são carregadas negativamente, migram para o polo positivo (Lagos-Susaeta *et al.*, 2020), gerando um padrão de bandas distinto para cada microrganismo. A visualização dessas bandas é determinada através da coloração com baixas concentrações de corantes intercalantes fluorescentes, como o GelRed. Esse corante é intercalante pois se intercala entre as bases de DNA e fluoresce quando exposto a radiações de excitação com comprimentos de ondas específicos, mais comumente na faixa do ultravioleta (UV), produzindo então as bandas (Green; Sambrook, 2019). Esses padrões de banda são utilizados para fazer a discriminação entre cepas bacterianas, sendo possível realizar a distinção de estirpes dentro de uma mesma espécie (Versalovic *et al.*, 1994).

Embora essa técnica não permita identificar de maneira direta o microrganismo a partir do padrão de bandas, ela tem sido amplamente utilizada para a análise da diversidade genética de microrganismos através da comparação dos padrões de bandas. Isso porque cepas que apresentam os mesmos padrões de “barcode” possuem, de maneira geral, genes conservados semelhantes ou idênticos (Efstathiadou; Savvas; Tampakaki, 2020; Mohamed; Jaiswal; Dakora, 2018). Diversos estudos comprovam a eficiência desta técnica para a diferenciação de estirpes bacterianas (Borba *et al.*, 2020; Chibeba *et al.*, 2020; Zuluaga *et al.*, 2020; Efstathiadou; Savvas; Tampakaki, 2020; Getahun *et al.*, 2020; Wójcik; Kalita;

Malek, 2019; Mohammed; Jaiswal; Dakora, 2018; Abdellatif *et al.*, 2017; Michel *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2017; Guimarães *et al.*, 2012).

Apesar da sua grande capacidade discriminatória, as técnicas baseadas em DNA requerem infraestrutura com custo muito alto para análises rotineiras, seja em fazendas ou em laboratórios de pequena escala. Por exemplo, no caso do BOX-PCR, seriam necessários equipamentos como termociclador, cuba e fonte de eletroforese e transiluminador. Esses equipamentos custam em média R\$60.000,00 para o termociclador, R\$10.000,00 e R\$5.000,00 para a fonte e cuba de eletroforese e R\$14.000,00 para o fotodocumentador, tomando como base as marcas de equipamentos mais tradicionais e mais utilizadas em laboratórios de análises moleculares. Assim, uma estrutura mínima para a execução de tais análises custaria em torno de R\$89.000,00. Parte do alto custo desses equipamentos se deve ao fato de possuírem uma tecnologia fechada e de domínio apenas da empresa fabricante.

Entretanto, através da aplicação de princípios da ciência aberta e da utilização de componentes facilmente acessíveis e de baixo custo é possível realizar a produção de equipamentos de custo reduzido que podem ser disponibilizados de maneira aberta e gratuita. Assim, a comunidade de usuários pode aprimorá-los e aplicá-los em contextos e regiões específicas, a um preço muito abaixo do que os equipamentos disponíveis no mercado.

### **2.3 Ciência Aberta**

De acordo com a Recomendação da Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) sobre Ciência e Pesquisa Científica de 2017,

O termo ciência significa o empreendimento pelo qual a humanidade, agindo individualmente ou em pequenos ou grandes grupos, realiza uma tentativa organizada, em cooperação e em concorrência, por meio do estudo objetivo dos fenômenos observados e sua validação por meio do compartilhamento de descobertas e dados e da revisão por pares (peer review), para descobrir e dominar a cadeia de causalidades, relações ou interações; reúne de forma coordenada subsistemas de conhecimento por meio da reflexão sistemática e da conceitualização; e, assim, fornece a oportunidade de utilizar, em seu próprio benefício, a compreensão dos processos e fenômenos que ocorrem na natureza e na sociedade (UNESCO, 2017).

Baseado nas premissas de integridade acadêmica, excelência científica e na liberdade acadêmica, a ciência aberta surge como um novo modelo de ciência, a partir da

integração de práticas voltadas para a reprodutibilidade, a transparência, o compartilhamento e a colaboração do conhecimento científico. Isso permite uma maior disponibilidade de conteúdos, ferramentas e processos científicos a sociedade como um todo. Sendo assim, de acordo com a UNESCO, a ciência aberta é uma ciência inclusiva que possui o objetivo de disponibilizar publicamente o conhecimento científico, de modo que esse conhecimento seja acessível e passível de ser reutilizável, além de incentivar o aumento das contribuições e colaborações científicas. Esse conhecimento científico disponibilizado é reutilizável por todos aqueles que tenham interesse e, através da ciência aberta, há, portanto, um aumento nas colaborações e no compartilhamento de informações científicas em prol da sociedade, não somente para a tradicional comunidade científica (UNESCO, 2021).

O conhecimento científico aberto permite o acesso aberto a dados de pesquisa, metadados, publicações científicas, recursos educacionais, softwares, códigos-fonte e hardwares (Figura 1). Para isso, estes recursos devem estar disponíveis em domínio público e/ou sob licença aberta (UNESCO, 2021). Assim, através da adoção da licença aberta, outros usuários são capazes de acessar, reutilizar, redirecionar e modificar tais projetos, de modo que possam ser adaptados às condições necessárias a cada usuário ou grupo de usuários.



**Figura 1:** Recursos abertos da Ciência Aberta. UNESCO, 2021.

Para que o uso ciência aberta seja efetivo, a UNESCO estabeleceu valores fundamentais em função das implicações éticas, legais, políticas, sociais e jurídicas. Esses valores estão baseados na qualidade e integridade da pesquisa científica, no benefício coletivo para a humanidade, na equidade e justiça entre pesquisadores de diferentes países de situações econômicas distintas, na diversidade e inclusão da comunidade científica plural assim como com o público em geral. Além disso, princípios fundamentais devem ser seguidos, como a transparência e reprodutibilidade, igualdade de oportunidades para todos os interessados na ciência aberta, responsabilidade, respeito e prestação de contas, colaboração, participação e inclusão em todas as etapas do processo científico, flexibilidade em função da diversa gama de sistemas científicos e comunidades envolvidas e, por fim, sustentabilidade para que haja acesso permanente e irrestrito a todos (Figura 2) (UNESCO, 2021).



**Figura 2:** Valores e Princípios da Ciência Aberta. UNESCO, 2021.

Dentre as diversas vantagens da utilização de projetos de licença aberta incluem-se a redução no custo de peças e fabricação, a capacidade de personalização do design, a redução na complexidade geral do objeto e a reprodutibilidade. Além disso, outro fator chave para o sucesso desse movimento é a eliminação de componentes especiais que não são de fácil aquisição (Oberloier; Pearce, 2018).

Com o objetivo de adaptar a prática científica à nova era tecnológica oriunda da quarta revolução industrial, caracterizada pela tecnologia da informação e da comunicação, percebeu-se uma grande mudança em diversos campos de pesquisa (Kim *et al.*, 2020) que agora são focados no movimento do Código Aberto. Esse movimento surgiu como uma nova abordagem para a condução de pesquisas científicas (Dryden *et al.*, 2017), baseados no acesso gratuito à designs e códigos de software e hardware, incluindo os direitos para licenciamento e modificação do equipamento desenvolvido para atender às necessidades específicas de cada usuário (Davis; Foster; Grinias, 2021; Martinez, 2018). Isso deu origem ao movimento do Laboratório Aberto (“*Open Labware*”), vertente da Ciência Aberta. Assim, o movimento “*Open Labware*” permitiu que cientistas pudessem desenvolver tecnologias para serem utilizadas em suas pesquisas cotidianas (Wickert *et al.*, 2019; Baden *et al.*, 2015) ou em análises de rotina, de uma maneira fácil e rápida (Martinez, 2018).



No entanto, isso só foi possível devido à maior acessibilidade a ferramentas como impressoras 3D e microcontroladores de baixo custo (Davis; Foster; Griniais, 2021). A tecnologia de impressão 3D permite a produção de componentes personalizados de uma forma rápida, econômica e sob medida a partir de plásticos (Jasiuk *et al.*, 2018), permitindo assim a produção de novos equipamentos laboratoriais ou o desenvolvimento de protótipos para adaptação de equipamentos de já existentes (Kuhnke *et al.*, 2022).

Entre os microcontroladores mais amplamente usados em projetos abertos, o Arduíno se destaca como uma plataforma eletrônica de código aberto com hardware de baixo custo e software de fácil uso para controlar circuitos eletrônicos (Banzi; Shiloh, 2014). Ele é composto por uma placa de circuito eletrônico que pode ser facilmente programada em uma plataforma própria e gratuita (Arduino IDE) (D'ausilio, 2012), ou mesmo em outras plataformas também gratuitamente disponíveis (e.g. PlatformIO). Essas placas são capazes de ler sinais de entradas analógicos e digitais e também gerar sinais de saída e, por isso, são comumente chamados de dispositivos de E/S (Chan *et al.*, 2021).

Quando comparados a outros microcontroladores, o Arduino apresenta um baixo custo, além de sua plataforma de desenvolvimento integrado (IDE) ser simples e compatível com diferentes sistemas operacionais (Windows, Macintosh OSX e Linux) e utilizar a linguagem de programação C++ simplificada (Ali *et al.*, 2016).

## **2.4 Hardware Abertos aplicados a Técnicas Moleculares**

Ao longo dos últimos anos, várias iniciativas foram feitas no sentido de reproduzir a funcionalidade de equipamentos comerciais utilizados em análises moleculares usando equipamentos de baixo custo e com projetos publicamente disponíveis. Por exemplo, Chan *et al.* (2016) desenvolveu um termociclador simples e de baixo custo (US\$130,00) para a detecção de RNA viral por transcrição reversa de PCR (RT-PCR) para doenças infecciosas. Esse termociclador possui três recipientes de aço inoxidável, termicamente isolados a vácuo provenientes do mercado alimentício. Para cada etapa da reação de RT-PCR é utilizado um recipiente com água e uma película de óleo mineral em uma temperatura específica de 95°C a 97°C para a desnaturação, 60°C e 65°C para anelamento e extensão. Um terceiro recipiente com água e uma película de óleo mineral na temperatura de 50°C foi utilizado para a reação de RT-PCR. Na necessidade de reaquecimento da água, um aquecedor portátil pode ser usado. A transferência automatizada dos tubos para cada recipiente é dada através de um braço robótico controlado por Arduino. Apesar de efetivo para a aplicação proposta

pelos autores, o projeto apresentado por Chan *et al.* (2016) não apresenta um controle de temperatura ativo que permita a execução da PCR por longos períodos, o que limita sua efetividade para o BOX-PCR. Além disso, em caso de necessidade de reaquecimento dos recipientes, o sistema não é automatizado para realizar tal procedimento.

Oliveira *et al.* (2021) desenvolveu um termociclador de baixo custo (US\$50,00 em peças) para a detecção de doenças bacterianas e virais, como sífilis e Zika vírus, respectivamente. O equipamento foi construído utilizando duas placas de circuito impresso (PCB) de dupla face com uma fina camada de cobre incorporada. Na placa inferior, foi instalado um resistor de cobre que atravessa ambos lados da placa, enquanto na placa superior, o resistor foi posicionado apenas no lado inferior. Na placa superior, há um orifício de 8,5 mm de diâmetro contendo um tubo de cobre de 7 mm, no qual o microtubo foi posicionado. Esse tubo de cobre tem como objetivo segurar e aquecer o tubo de PCR. Em ambas placas PCB, há dispositivos/termistores usados como sensores de temperatura, que estão soldados próximos ao resistor. O bloco de PCR foi montado com a utilização de quatro parafusos com as cabeças posicionadas na base. Nesse espaço, foi inserido um ventilador de computador e as duas placas PCB foram inseridas. Um Arduino Nano foi integrado à placa principal, juntamente com 3 Mosfets, utilizados para ligar e desligar os resistores das PCB e o ventilador. Além disso, foram incorporados cinco resistores, um LED simples, um LED RGB e dois capacitores. Três divisores de tensão foram usados com resistores e termistores, sendo dois para medir a temperatura das duas placas e outro para calibrar o sistema. O instrumento foi alimentado com um adaptador do tipo AC/DC. Para facilitar a interação com o dispositivo, uma interface visual foi desenvolvida utilizando o Elipse Studio. Essa interface permite o controle dos principais parâmetros, a calibração do dispositivo e a visualização do comportamento da amostra por meio de um gráfico em tempo real. Porém, a obtenção das informações em tempo real exigiu a implementação do protocolo Modbus para estabelecer a comunicação entre o Arduino e o Elipse. A amplificação do DNA foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Já para o RNA a condição de ciclo foi de 51°C por 30 minutos, 95°C por 15 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Um sistema de controle PID foi implementado em conjunto com um sistema de calibração de temperatura para garantir um controle preciso da temperatura. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose de 2% contendo 0,4 µg/mL de brometo de etídio. Os resultados demonstraram que o equipamento desenvolvido pelos autores apresentou desempenho comparável ao de um termociclador comercial, sendo capaz

de detectar sífilis e Zika vírus com eficiência. Esses resultados indicam que essa tecnologia simples, prática e acessível é uma alternativa viável para diagnósticos em laboratórios com recursos financeiros limitados.

Gutzweiler *et al.* (2020) apresentou um sistema microfluídico aberto para a condução da separação de moléculas de DNA via eletroforese de alta sensibilidade e baixo custo (< US\$0,1 por amostra). Esse sistema compreende dois reservatórios opostos de volumes de 2 a 4  $\mu\text{L}$ , uma linha feita de gel como canal de separação e interconectando os reservatórios. A linha de gel líquido possui uma seção transversal semicircular de largura adaptável ( $\sim 200\text{-}600 \mu\text{m}$ ) e altura ( $\sim 30\text{-}80 \mu\text{m}$ ), e comprimento típico de 15-55 mm. A amostra é colocada nessa linha por meio de gotículas e, para evitar sua evaporação, estruturas aquosas com óleo mineral são colocadas para cobrir as amostras. O campo elétrico é aplicado através do contato do pino de óleo dos canais microfluídicos ou por meio de eletrodos depositados no substrato. O layout do equipamento é adaptável sob diferentes demandas, além de possuir fabricação fácil e rápida. Essa nova abordagem obteve sucesso na separação de fragmentos de DNA variando de 100 - 1000 pares de bases de comprimento.

Já Motohashi (2019) desenvolveu dois sistemas de detecção de gel de agarose DNA simples, de baixo custo, altamente sensíveis e com utilização de corantes de DNA não mutagênicos (Midori Green Direct, Novel Juice, Safelook Load-Green, SYBR Safe, EZ-Vision e Safelook Load-White). O primeiro sistema foi constituído por uma combinação de luz LED ciano de 490 nm e um filtro de passagem de luz curta (510 nm). Já para o segundo sistema foi utilizado radiação ultravioleta com pico de emissão de 360 nm. O primeiro sistema foi capaz de detectar fragmentos de DNA com a mesma sensibilidade de um transiluminador ultravioleta (UV) padrão. No segundo experimento, o sistema ocasionou menores danos ao DNA devido à menor energia dos raios UV de maior comprimento de onda, se comparado com os de menor comprimento, além de apresentar sensibilidade maior quando comparado ao transiluminador padrão. O custo do hardware do sistema de LED ciano e filtro de emissão foi de, aproximadamente, US\$300. Para o sistema baseado em radiação ultravioleta o custo foi em torno de US\$730, possuindo custos menores do que um transiluminador UV (> US\$1.000).

Cunha *et al.* (2020) projetaram um dispositivo de detecção de DNA/RNA de baixo custo com capacidade de obtenção de dados qualitativos e semi-quantitativos por meio da análise de gel de agarose. O DNA utilizado foi um produto oriundo da PCR de um fragmento conservado do gene *18S rRNA* do camarão (*Penaeus vannamei*). Por meio do uso de tecnologia e material de fácil acesso, como LEDs, impressão 3D, smartphone e

software personalizado, os autores foram capazes de desenvolver um equipamento passível de substituir o transiluminador UV padrão. Esse dispositivo é capaz de atuar na faixa de absorção da luz visível dos corantes de DNA/RNA comumente utilizados em análises moleculares (SYBR Green®, GelRed® e brometo de etídio). O sistema de hardware foi feito com um microcontrolador que possui conexões wi-fi e Bluetooth, além de um controlador adaptável a diferentes corantes. Esse adaptador foi capaz de selecionar o comprimento de onda emitido pelo sistema de iluminação de acordo com o corante utilizado. Em relação ao software, o sistema possui dois softwares operacionais. O primeiro é do microcontrolador (EPS32) que tem como função controlar o sistema de modulação por largura de pulso dos chips de LED e a comunicação com o smartphone via Bluetooth. Já o segundo é o aplicativo Android para smartphone, que é responsável pela conexão ao EPS32 via Bluetooth, além do gerenciamento do tipo de corante utilizado, sua frequência e intensidade e a captura de imagens. Por meio dos resultados obtidos, esse equipamento foi capaz de substituir o transiluminador UV convencional, permitindo a detecção de bandas de DNA coradas com três corantes comerciais. O custo médio desse equipamento foi de US\$53,46, sem contabilizar o custo do smartphone que, de toda maneira, é significativamente mais barato do que os equipamentos padrões para tal utilização.

Outros projetos de equipamentos laboratoriais também foram criados com base nesse conceito como, por exemplo, o laboratório de DNA “*do-it-yourself*” (Damase *et al.*, 2015), microbomba (Martinez, 2018), micropipetas (Baden, 2015) e um misturador e agitador de amostras rotativo (Dhankani; Pearce, 2017), dentre outros tipos de equipamentos.

## **2.5 Hardware Abertos aplicados a Técnicas Moleculares na Agricultura**

Os exemplos apresentados acima demonstram o potencial de hardware abertos para tornar acessível ao público em geral ferramentas poderosas, como as técnicas moleculares. A maior parte desses exemplos, entretanto, são voltados para fins medicinais, havendo necessidade de também desenvolver técnicas para resolver problemas importantes na agricultura. Por exemplo, o controle de qualidade de bioinsumos produzidos “*on farm*” usando técnicas moleculares pode ser viabilizado numa escala mais ampla a partir da disponibilização de protocolos e equipamentos acessíveis para pequenos laboratórios locais, viáveis inclusive na escala da propriedade rural, associações, cooperativas, entre outros. Especificamente, é possível que o desenvolvimento da instrumentação necessária para a

amplificação de fragmentos de DNA através de técnicas moleculares, como o BOX-PCR, e a subsequente análise das bandas resultantes via eletroforese em gel de agarose, torne essa técnica mais amplamente acessível ao público em geral a um baixo custo, graças ao uso de microcontroladores, componentes eletrônicos de fácil obtenção e peças produzidas através de impressão 3D, hoje uma tecnologia amplamente acessível.

A partir de iniciativas como essa, espera-se que técnicas moleculares possam se tornar práticas comuns no monitoramento da qualidade dos bioinsumos produzidos “*on farm*”. Esses equipamentos são financeiramente acessíveis e apresentam tempo de resposta suficientemente rápido para viabilizar ajustes na produção de bioinsumos, visando aprimorar sua qualidade. Essa abordagem tem o potencial de impulsionar a eficácia e a segurança dos bioinsumos, contribuindo para a sustentabilidade da atividade agrícola do país, e estando diretamente relacionada com o segundo objetivo de Desenvolvimento Sustentável da ONU (Fome Zero e Agricultura Sustentável) (ONU).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

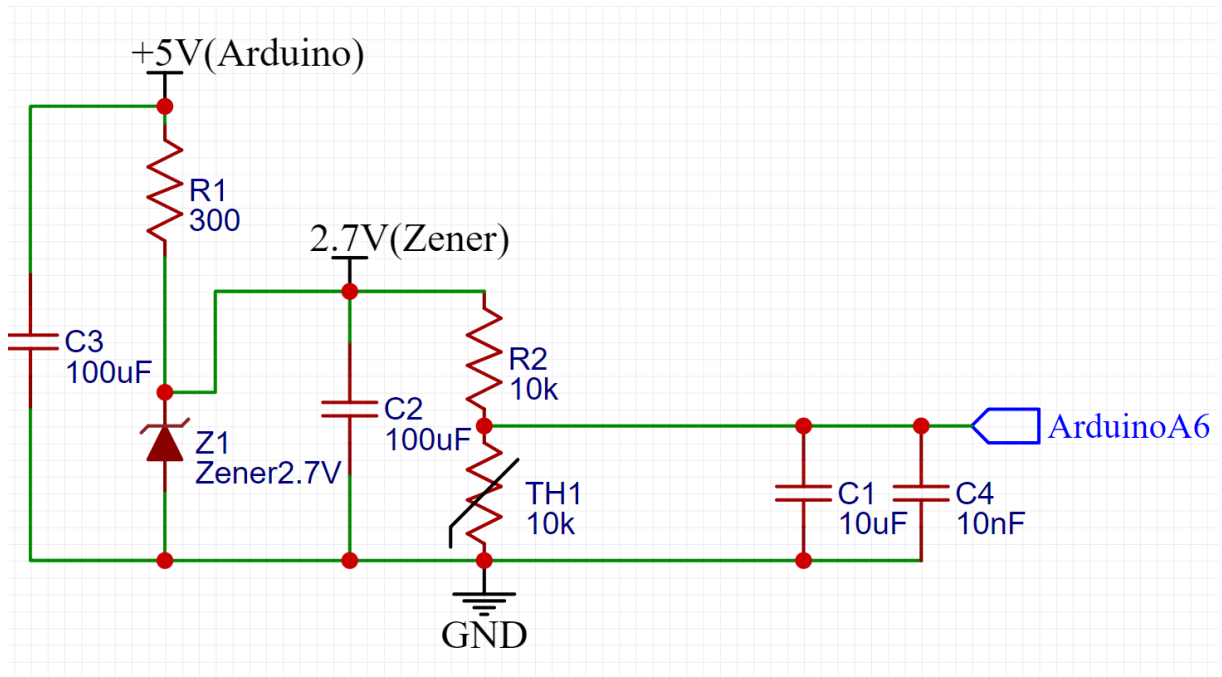
#### **SEÇÃO 1 - Termociclador**

##### **3.1 Desenvolvimento de termômetros digitais para o monitoramento/controle de temperatura**

Como a reação em cadeia da polimerase (PCR) é baseada em ciclos com mudanças de temperatura, sendo bastante sensível a variações em pequenas faixas, é preciso manter uma estabilidade térmica ao longo das etapas dessa reação para garantir confiabilidade e consistência dos resultados. Três etapas são fundamentais para a reação de PCR, sendo elas: desnaturação das duplas hélices e formação de duas fitas de DNA separadas (94-98°C); anelamento, quando os primers se ligam às regiões específicas do DNA (50-65°C); e por fim, a extensão, etapa em que a enzima DNA polimerase sintetiza uma nova cadeia de DNA, usando os primers como pontos de partida (72°C) (Saiki *et al.*, 1985).

Neste trabalho, devido à necessidade de conduzir a PCR por longos períodos, fez-se a opção por um sistema de controle ativo de temperatura, o que requer medições confiáveis da temperatura em tempo real. Para isso, termômetros digitais foram desenvolvidos utilizando termistores de 10 k $\Omega$ , com coeficientes de temperatura negativo (NTC), monitorados por uma placa Arduino Nano. Os termistores do tipo NTC são

resistores termossensíveis cuja resistência diminui à medida que a temperatura aumenta (Xia *et al.*, 2014) e, através de um divisor de tensão, ou seja, resistores conectados em série, permitem medir indiretamente variações de temperatura através de variações na tensão (ver Figura 3). Essas leituras, entretanto, precisam ser calibradas para sua conversão em valores de temperatura. Para aumentar a estabilidade das leituras, a tensão de entrada no divisor de tensão foi estabilizada por um diodo Zener.



**Figura 3:** Esquema do circuito eletrônico utilizado para monitoramento de temperaturas através de um termistor (TH1). Um diodo zener (Z1) foi utilizado para estabilizar a tensão de entrada em 2,7V no divisor de tensão formado por um resistor (R2) ligado em série com o termistor (TH1). A saída do divisor de tensão foi ligada à porta analógica A6 do Arduino para leitura da tensão, que é convertida para uma escala digital variando entre 0 (para tensão mínima) e 1023 (para a tensão máxima de referência).

Para a conversão das leituras do Arduino na porta analógica (Figura 3) em valores de temperatura, curvas de calibração foram elaboradas. Para isso, um gradiente de temperatura foi estabelecido, variando de 40°C a 98°C, com incremento de 1°C e tempo de estabilização para cada temperatura de 1 minuto. Portanto, para cada temperatura dentro do intervalo estabelecido, o sistema esperou 1 minuto para realizar a leitura, o que garantiu uma estabilização da temperatura e, conseqüentemente, leituras mais precisas e estáveis. As leituras do Arduino foram transmitidas via comunicação serial a um laptop e registradas com o software hTerm (versão 8.9). Em seguida, essas leituras foram analisadas no software R (versão 7.1) para estimar modelos de regressão segmentada (quatro segmentos) com polinômios de terceira ordem. A escolha por esse modelo deu-se em razão da não linearidade dos dados e pela simplicidade de implementação do modelo ajustado no Arduino após a análise. Para testar a precisão dos termômetros após a calibração, um novo

gradiente de temperaturas, seguindo o mesmo padrão do anterior, foi aplicado, e os valores de temperatura registrados pelo Arduino foram comparados com os valores reais para o cálculo do erro médio absoluto (mean absolute error - MAE) e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Após verificar a boa precisão e sensibilidade desses termômetros, conforme será apresentado no item 4.1, fez-se a opção por utilizar esse desenho nas etapas subsequentes de desenvolvimento e aferição do termociclador aqui proposto.

### **3.2 Conceito geral do termociclador**

Ao contrário dos termocicladores comerciais, em que o mesmo bloco tem a temperatura alterada de acordo com a etapa do ciclo da PCR e as amostras permanecem fixas, nosso design é baseado em quatro recipientes (três para reações e um para resfriamento) com água em diferentes temperaturas fixas, com as amostras sendo posicionadas em cada recipiente de acordo com a etapa do ciclo. Um primeiro recipiente é utilizado para o resfriamento, contendo apenas água em temperatura ambiente. Um segundo para a etapa de desnaturação, cuja temperatura foi ajustada para 94°C. Para o anelamento, um terceiro recipiente foi utilizado com temperatura de 53°C. Já para a extensão, um quarto recipiente com temperatura de 72°C (em função da temperatura ótima da Taq-polimerase utilizada). A etapa de resfriamento foi acrescentada após a desnaturação com o objetivo de acelerar a redução da temperatura, de modo que seja possível atingir a temperatura de anelamento mais rapidamente. Isso porque em testes preliminares foi constatado que o tempo de resfriamento quando a amostra era diretamente transferida da desnaturação para o anelamento era muito lento, ocasionando uma demora na convergência para a temperatura desejada.

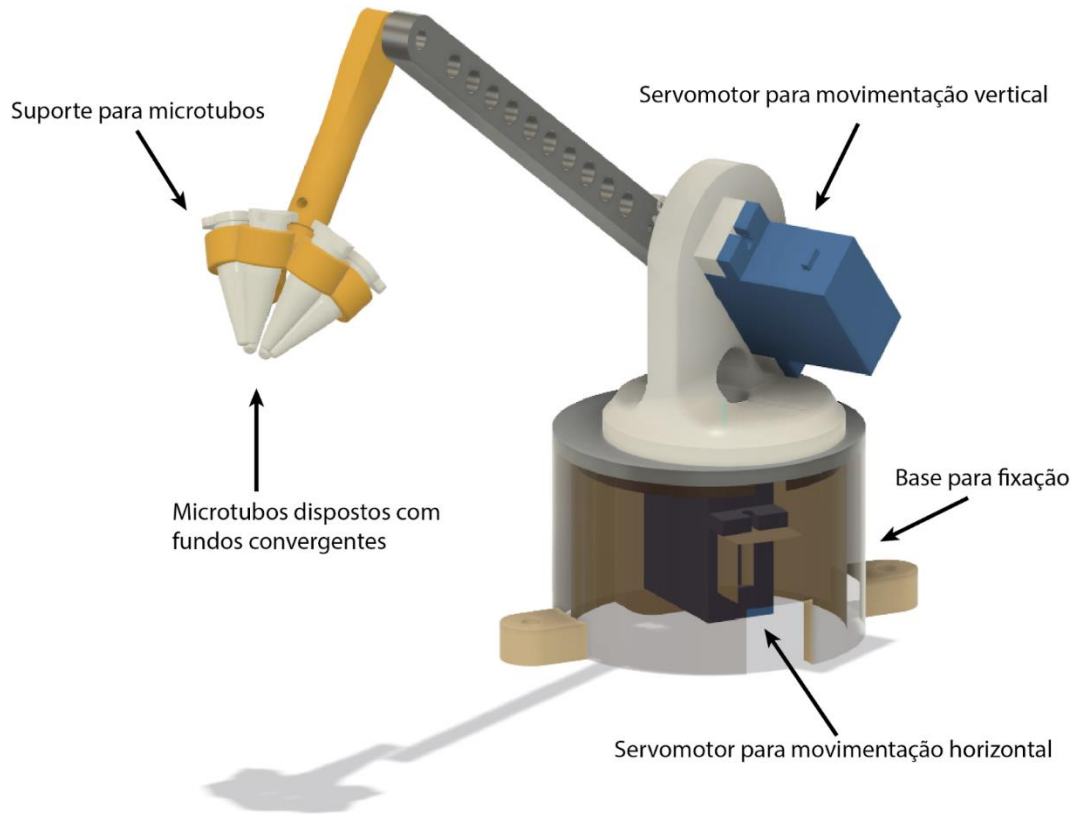
A opção de utilizar um recipiente para cada temperatura se deu pela maior simplicidade do design, uma vez que se fosse utilizado apenas um bloco com temperaturas variáveis, haveria uma dificuldade muito maior para estabilizar rapidamente as temperaturas desejadas, o que aumentaria a complexidade do aparelho. Para evitar trocas de calor com o ambiente e aumentar a estabilidade da temperatura, uma camada de 3 cm de óleo mineral foi colocada na superfície da água em cada recipiente, exceto no de resfriamento.

Para permitir a ciclagem das temperaturas, as amostras são automaticamente transferidas entre recipientes pelo tempo determinado respectivo a cada etapa do ciclo

através de um braço robótico composto por dois servos motores (SG90), controlados por uma placa Arduino Nano, programada na plataforma Arduino IDE 2.0, conforme código publicamente disponível no repositório do GitHub desse projeto (seção 3.10). O micro servo SG90 foi escolhido por possuir uma série de vantagens, como a compatibilidade com os principais microcontroladores do mercado, um ângulo de rotação de 180° (90° em cada direção), e boa relação custo benefício. A opção de usar uma placa Arduino separadamente para o controle do braço robótico deu-se para evitar que os ruídos eletrônicos introduzidos pela movimentação dos servomotores prejudicassem a precisão das leituras do controlador de temperaturas descritos na seção a seguir.

As peças do braço robótico foram desenhadas no AutoDesk Fusion 360® e posteriormente confeccionadas usando filamento plástico ABS em uma impressora 3D (Creality Ender-3 Pro®). A peça para encaixe dos microtubos no braço robótico foi também desenhada no AutoDesk Fusion 360®, mas escolheu-se impressão em resina líquida (Impressora Creality Halot One®) devido ao nível de detalhamento e ao pequeno tamanho da peça (Figura 4). Esse suporte é capaz de acoplar seis tubos de PCR por rodada, permitindo a inclusão de três pares de amostras a serem comparadas. Com o objetivo de evitar a transferência de líquido de um recipiente para outro, o braço robótico foi configurado para esperar três segundos acima do recipiente antes de a amostra ser transferida para o próximo recipiente, permitindo o escoamento do líquido.





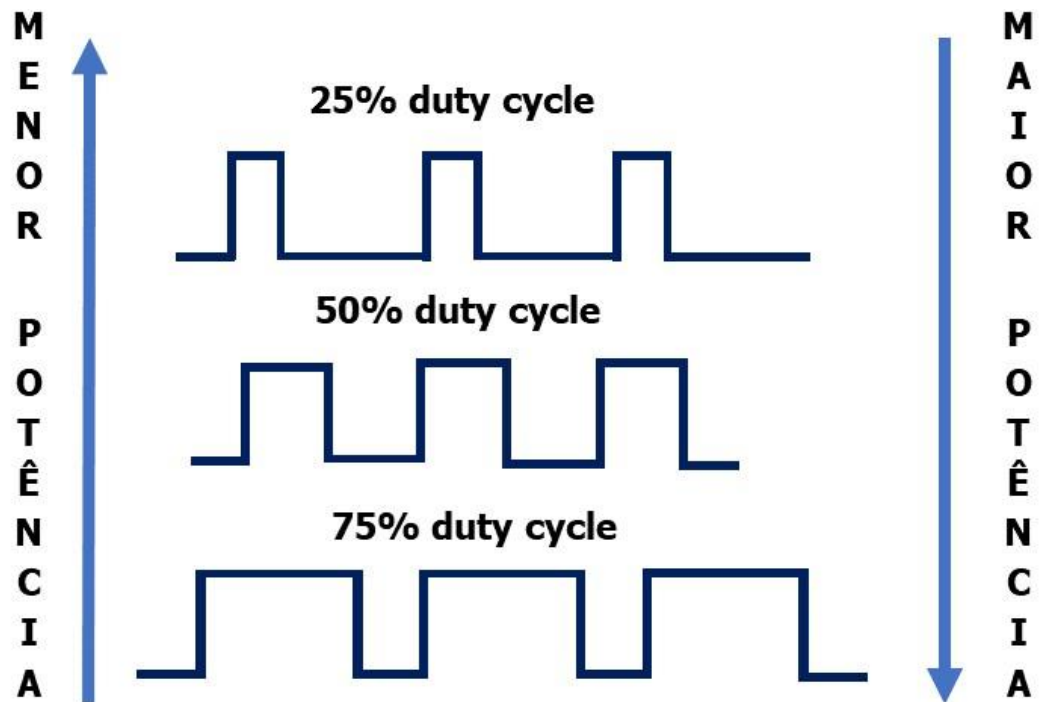
**Figura 4:** Representação em 3D do braço robótico usado para transferir as amostras entre os recipientes. As movimentações vertical e horizontal são feitas por servomotores (SG90S) controlados por uma placa Arduino Nano (não representada na figura). Todas as peças, exceto o suporte para microtubos, foram impressas com filamento ABS. O suporte para microtubos foi impresso em resina e projetado para que os fundos dos microtubos converjam para a mesma posição, minimizando o potencial do efeito de qualquer heterogeneidade na distribuição da temperatura dentro dos recipientes de aquecimento. Dimensões exatas desse modelo podem ser encontradas nos arquivos disponíveis no repositório do GitHub desse projeto.

O design aqui apresentado é inspirado naquele proposto por Chain *et al.* (2016). No entanto, um diferencial importante do termociclador proposto neste estudo é o controle ativo de temperatura, que é ausente no proposto por Chain *et al.* (2016). No caso da técnica de BOX-PCR, em que a reação ocorre por 4 horas e 30 minutos, apenas o ajuste inicial da temperatura não é suficiente, como esses autores propuseram. O resfriamento ao longo do tempo pode alterar os resultados, como a não desnaturação do DNA devido às baixas temperaturas, de modo que as fitas simples não fiquem expostas, ou então no anelamento inespecífico, situação em que os *primers* se anelam em posições incorretas (Burpo, 2001).

Em razão disso, foi incorporado nesse design um controle ativo de temperatura através de um controlador PI que será detalhado adiante. Apesar de aumentar a complexidade do design, esse controle ativo de temperaturas é fundamental para tornar o termociclador apto para reações mais longas, como o BOX-PCR.

### 3.3 Controle de Temperatura

A temperatura em cada recipiente é ajustada através de uma resistência de 4 ohm feita a partir de um fio de Níquel-Cromo, controlada por uma placa Arduino Nano através de modulação por largura de pulso (*Pulse Width Modulation* - PWM). O PWM é uma técnica de modulação capaz de gerar sinais analógicos por meio de um dispositivo digital, como um microcontrolador (Christ; Wernli, 2014), sendo amplamente utilizado para controlar a quantidade de corrente, e conseqüentemente a potência, fornecida a um dispositivo (Pomilio, 2014). Como o Arduino é incapaz de conduzir a corrente elétrica necessária para aquecer a resistência, essa modulação é mediada através de um MOSFET (modelo RLZ44NPBF), cuja porta é conectada a uma das saídas digitais do Arduino capazes de gerar pulsos. Esse pulso pode variar de 0 a 255, sendo que 0 indica nenhuma potência aplicada na resistência e 255 representa a potência máxima. Quando esse sinal de entrada possui alta amplitude, o pulso permanece por mais tempo no estado ligado; em contraste, quando possui menor amplitude, o pulso passa mais tempo no estado desligado (Christ; Wernli, 2014). A proporção do período total em que o pulso se mantém em nível alto é conhecida como *duty-cycle* (Figura 5) (Boglietti *et al.*, 1993).



**Figura 5:** Representação do duty-cycle e sua relação com a potência. Do autor, 2023.

Nesse controlador, a temperatura foi medida separadamente em cada recipiente através de um termistor calibrado conforme explicado no item 3.1. Para a definição da potência a ser aplicada foi utilizado um controlador do tipo PI, ou seja, composto por uma componente proporcional e outra componente integrativa. A componente proporcional faz com que a potência aplicada na resistência seja diretamente proporcional à diferença entre a temperatura real e a temperatura alvo, sendo proporcional em função de uma constante denominada de  $K_p$ . Já a componente integral cumpre o papel adicional de eliminar o erro estacionário, corrigindo os erros sistemáticos, ou seja, situações em que a temperatura real permanece abaixo ou acima da desejada, de forma que a constante  $K_i$  força a temperatura real atingir o alvo (Åström; Hägglund, 1995; Borase *et al.*, 2021).

Para otimizar a estabilização da temperatura utilizou-se de uma abordagem empírica em que foi testado uma combinação arbitrária de valores das componentes proporcional e integrativa. Para o recipiente de desnaturação foram testados os seguintes valores de  $K_p$  e  $K_i$ , respectivamente: 25-1, 50-1, 100-1, 25-5, 50-5, 100-5, 50-10, 100-10, 150-10. No anelamento, os seguintes valores foram utilizados: 25-1, 75-1, 125-1, 25-5, 75-5, 125-5, 50-10, 100-10, 150-10. Já para a extensão, os valores testados foram: 50-1, 100-1, 150-1, 50-5, 100-5, 150-5, 50-10, 100-10, 150-10. Os valores selecionados foram aqueles que

diminuíram as oscilações de temperatura e que apresentaram uma convergência mais rápida à temperatura desejada.

As temperaturas foram registradas através da comunicação serial entre uma placa de Arduino Nano e um notebook por meio do software hTERM. Os resultados foram processados em um script do R disponível no repositório do GitHub relativo a este projeto (seção 3.10).

### **3.4 Avaliação da ciclagem das temperaturas**

Com o objetivo de avaliar a variação da temperatura no interior do microtubo de PCR, simulando, portanto, a reação de PCR, o termistor calibrado conforme item 3.1 foi inserido em um microtubo contendo 10  $\mu$ L de pasta térmica e foi devidamente selado para evitar a entrada de água.

O microtubo com o termistor foi avaliado tanto no termociclador padrão quanto no termociclador de baixo custo. As temperaturas de ambos os testes foram registradas no software hTERM e o tempo necessário para a convergência da temperatura para a temperatura ideal foi avaliado. A partir dessa avaliação foi possível definir o tempo adicional em cada etapa do ciclo para permitir a convergência das temperaturas para atingir a temperatura ideal.

O tempo adicional definido para cada etapa da reação foi baseado na metodologia original desenvolvida por Versalovic *et al.* (1994), sendo que o tempo de transição foi acrescido nos valores de tempo originais, de acordo com as temperaturas de transição observadas (Figura 6).

ETAPA	DESCRIÇÃO	TEMPO
Desnaturação Inicial	Amostras são colocadas no recipiente de desnaturação para separação da fita dupla de DNA.	5 min
Desnaturação	Amostras são colocadas no recipiente de desnaturação para separação da fita dupla de DNA.	1 min
Resfriamento	Amostras são colocadas no recipiente de resfriamento em temperatura ambiente para atingir a temperatura de anelamento.	5 s
Anelamento	Amostras são colocadas no recipiente de anelamento para ocorrer o anelamento do primer na fita simples.	1 min + 1 min (transição)
Extensão	Amostras são colocadas no recipiente de extensão para ocorrer a extensão da nova fita de DNA.	3 min + 1 min (transição)
Extensão Final	Amostras são colocadas no recipiente de extensão para ocorrer a extensão final das novas fitas de DNA.	16 minutos

35 vezes

**Figura 6:** Etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no termociclador de baixo custo. Do autor, 2023.

## SEÇÃO 2 - ESTIRPES UTILIZADAS E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

### 3.5 Origem das estirpes

Para prova de conceito da abordagem proposta, foram utilizadas bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) isoladas de nódulos de leguminosas. Essa escolha se deu pelo potencial de uso de BFN como bioinsumos, especialmente porque a produção “on farm” desses microrganismos é uma alternativa promissora para a difusão dessa tecnologia entre pequenos e médios produtores. Entre as bactérias selecionadas, aquelas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são particularmente difíceis de distinguir com base na filogenia molecular do gene *16S rRNA* (Costa *et al.*, 2017).

Ao total, foram utilizadas 6 estirpes (Tabela 1) provenientes da Coleção de Estirpes do Laboratório de Microbiologia e Processos Biológicos do Solo da Universidade Federal de Lavras, localizado no Departamento de Ciência do Solo.

**Tabela 1.** Estirpes utilizadas e sua origem.

<b>Estirpe</b>	<b>Origem</b>
UFLA 01-765 ( <i>Mesorhizobium</i> sp.)	Rangel <i>et al.</i> , 2016 (Estirpe eficiente em simbiose com <i>Leucaena leucocephala</i> em solo contaminado com teores elevados de Zinco)
UFLA 06-37 ( <i>Bradyrhizobium japonicum</i> )	Ribeiro <i>et al.</i> , 2015 (Estirpe eficiente em soja)
UFLA 1-100 ( <i>Azorhizobium doebereinae</i> )	Moreira <i>et al.</i> , 2006 (Estirpe eficiente em simbiose com <i>Sesbania virgata</i> )
UFLA 3-321 ( <i>Bradyrhizobium brasilense</i> )	Costa <i>et al.</i> , 2017
BR29   SEMIA 5019 ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> )	Embrapa Agrobiologia (Estirpe aprovada como inoculante de soja)
BR 96   SEMIA 587 ( <i>Bradyrhizobium elkanii</i> )	UFRGS (Estirpe aprovada como inoculante de soja)

Para avaliar a capacidade da metodologia em discriminar bactérias de diferentes grupos taxonômicos, foi realizado um ensaio com dois objetivos diferentes. O primeiro objetivo foi avaliar a discriminação de espécies dentro do gênero *Bradyrhizobium* e também a discriminação de estirpe dentro da mesma espécie. Para isso, 4 estirpes foram utilizadas, sendo duas *Bradyrhizobium elkanii*, uma *B. japonicum* e por fim, uma *B. brasilense*. Todas tiveram seu genoma sequenciado.

Já o segundo objetivo era de avaliar a capacidade discriminatória entre grupos mais filogeneticamente distintos de bactérias fixadoras de nitrogênio. Para isso, utilizou-se duas estirpes de gêneros diferentes, sendo uma *Mesorhizobium* sp. e outra *Azorhizobium doebereinae*. Gêneros diferentes apresentam maiores diferenças genéticas em comparação com estirpes da mesma espécie, sendo esperado que o BOX-PCR seja mais efetivo na diferenciação de organismos de gêneros distintos.

### 3.6 Crescimento das bactérias e extração do DNA bacteriano

O crescimento das estirpes UFLA 01-765, UFLA 06-37, UFLA 3-321, SEMIA 5019 e SEMIA 587 foi feito com meio 79 sólido (Fred; Waksman, 1928) (manitol 10 g L<sup>-1</sup>; solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10% 1 mL L<sup>-1</sup>; solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10% 4 mL L<sup>-1</sup>; solução MgSO<sub>4</sub> 10% 2 mL L<sup>-1</sup>; solução NaCl 10% 1 mL L<sup>-1</sup>; extrato de levedura em pó 0,4 g L<sup>-1</sup>; azul de bromatino 0,5 mL L<sup>-1</sup>). Já para a estirpe UFLA 1-100, foi utilizado o meio TY (triptona 5 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura em pó 3 g L<sup>-1</sup>, cloreto de cálcio dihidratado 0,9 g L<sup>-1</sup>, ágar 15 g L<sup>-1</sup>). Ambos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 120°C.

Para a extração do DNA bacteriano, colônias isoladas das bactérias crescidas em placas foram transferidas para microtubos de 200 µL contendo 100 µL de água ultrapura estéril e levadas para agitação. Em seguida, alíquotas de 10 µL do DNA em água foram colocadas em eppendorfs de 200 µL e armazenados em congelador. Essa abordagem foi utilizada em decorrência de testes preliminares em que foi observado que o armazenamento do DNA em microtubos de 200 µL e sua subsequente exposição a ciclos de congelamento e descongelamento propiciavam a degradação do material devido possivelmente à atividade de nucleases. O uso de alíquotas se torna vantajoso pois permite que apenas a quantidade necessária para a análise do dia seja retirada, minimizando perdas decorrentes da degradação do DNA.

### 3.7 Amplificação do DNA bacteriano via BOX-PCR

Na metodologia original de amplificação do DNA bacteriano por BOX-PCR, desenvolvida por Versalovic *et al.* (1994), o tempo total de amplificação é de aproximadamente sete horas. Isso porque a Taq-polimerase originalmente utilizada possuía uma baixa eficiência na fase de extensão da reação (100kb/min), demandando assim maior tempo para a amplificação do DNA. Atualmente, enzimas comercializadas para essa finalidade possuem maior eficiência (1000 kb/min), o que pode resultar em diminuição do tempo de reação.

A reação de amplificação (25 µL) foi realizada com os seguintes volumes (µL): 16,4 de água ultrapura estéril; 0,3 de dNTPs (10mM); 5,0 de Green buffer GoTaq®; 1,0 primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994) (0,3 µg µL<sup>-1</sup>); 0,3 de Taq (5U µL<sup>-1</sup>); 2,0 de DNA. Para o termociclador padrão utilizado em laboratório (Mastercycler® nexus), a reação de amplificação foi constituída de: um ciclo de

desnaturação inicial, a 95°C, por 5 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 53°C (anelamento) e 3 minutos a 72°C (extensão); um ciclo de extensão final, a 72°C, por 16 minutos, resultando em um tempo total de amplificação de 4 horas e 30 minutos.

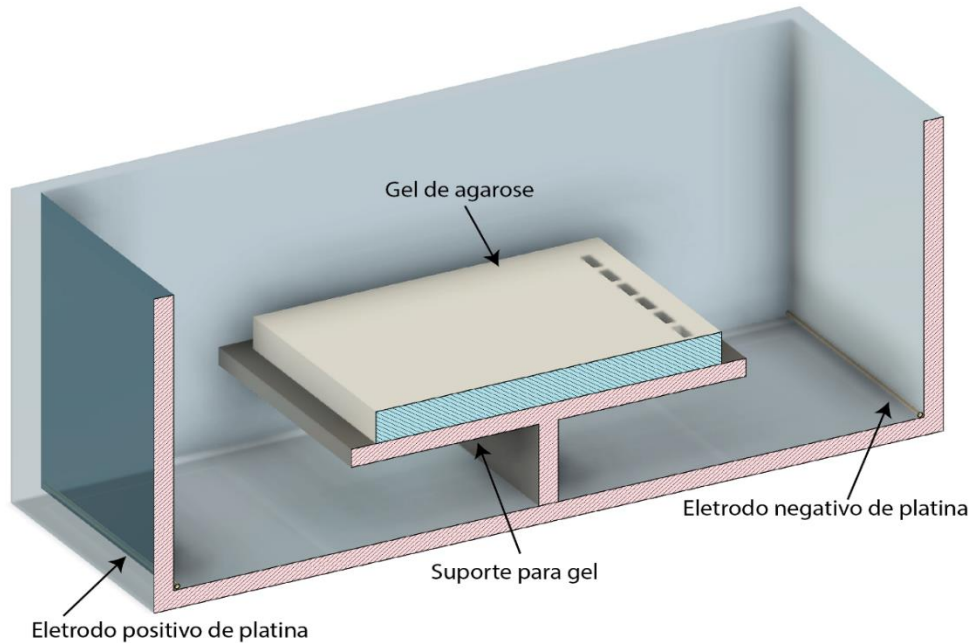
Com base nas informações sobre o tempo de transição de temperaturas obtidos conforme o item 3.4, para o termociclador desenvolvido neste trabalho, o tempo de cada ciclo foi modificado da seguinte forma: uma etapa de desnaturação inicial, a 95°C, por 5 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 5 segundos a temperatura ambiente (resfriamento), 1 minuto + 1 minuto de transição a 53°C (anelamento) e 3 minutos + 1 minuto de transição a 72°C (extensão); uma etapa final de extensão a 72°C por 16 minutos, resultando em um tempo total de amplificação de aproximadamente 6 horas.

### **SEÇÃO 3 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

#### **3.8 Fonte e cuba para eletroforese em gel de agarose**

A cuba de eletroforese desenvolvida neste projeto foi confeccionada a partir do corte manual de placas de acrílico e coladas com cola acrílica conforme apresentado na Figura 7. Utilizou-se dois fios de platina em cada extremidade da cuba para permitir a transmissão da corrente, com consequente formação do campo elétrico. Embora a platina seja facilmente acessível e não está sujeita a corrosão por eletrólise, o usuário pode optar por outro tipo de eletrodo de baixo custo como por exemplo o alumínio ou o grafite.





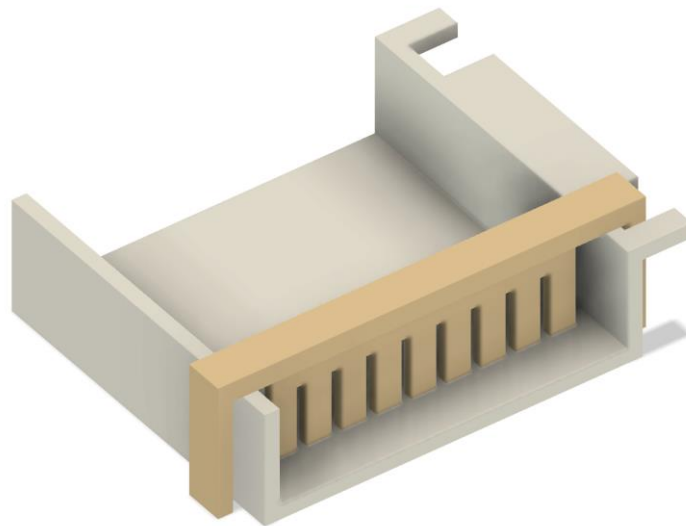
**Figura 7:** Representação em 3D mostrando uma visão parcial da cuba de eletroforese desenvolvida neste trabalho. O gel de agarose fica disposto sobre um suporte cuja base isola eletricamente os dois lados da cuba, forçando a corrente elétrica a passar exclusivamente através do gel. Um tampão TAE (não representado na figura) é adicionado em quantidade suficiente para cobrir ligeiramente o gel. O campo elétrico é formado a partir da aplicação de uma tensão negativa no eletrodo localizado acima dos poços no gel (à direita na imagem) e de uma tensão positiva no eletrodo localizado no lado contrário ao dos poços (à esquerda na imagem), de tal modo a induzir a migração do DNA e a separação de bandas por tamanho na direção do eletrodo negativo para o positivo. Dimensões exatas desse modelo podem ser encontradas nos arquivos disponíveis no repositório do GitHub desse projeto.

Para viabilizar o suprimento de corrente, em substituição à fonte de eletroforese convencional, foi utilizado um Dimmer Bivolt 1000w (Advanced G12) com o objetivo de reduzir a tensão para aquela desejada. A corrente alternada gerada pelo dimmer, embora inadequada para a eletroforese, que requer uma corrente contínua com polos positivo e negativo constantes, foi corrigida pela inclusão de uma ponte retificadora na saída do dimmer. Essa medida visou converter a tensão alternada em uma corrente contínua apropriada para o processo. A aferição da tensão nos eletrodos da cuba foi feita utilizando um multímetro digital, garantindo uma avaliação precisa do sistema.

### 3.9 Confeccção do gel e separação das bandas dos fragmentos amplificados por BOX-PCR

Para a confeccção do gel, foi feito um molde e um pente em 3D em 3D para formar os poços (Figura 8). Optou-se pelo tamanho de gel de 6,5cm x 7,0 cm devido ao número reduzido de amostras que foram analisadas.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 50 V, em gel de agarose a 2,0% em tampão TAE 1X (40 mL TAE 1X e 0,8 g de agarose), por um período de 2 horas e 30 minutos, em uma temperatura de 22°C (ar condicionado), tanto no equipamento padrão quanto no equipamento aqui desenvolvido (Figura 5). Foi utilizado 6 µL de uma mistura de Loading 1x e GelRed® e 4 µL de produto de PCR. Como referência para o peso molecular das bandas obtidas, foi utilizado o marcador Scada 100 bp DNA Ladder (Sinapse INC®) e o marcador 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific®). Em seguida, os géis foram expostos à luz UV e fotodocumentado por meio de um fotodocumentador L-PIX EX (Loccus®).



**Figura 8:** Modelo para impressão 3D do molde e pente necessários para confeccção do gel de agarose. Arquivo original disponível no repositório do GitHub desse projeto.

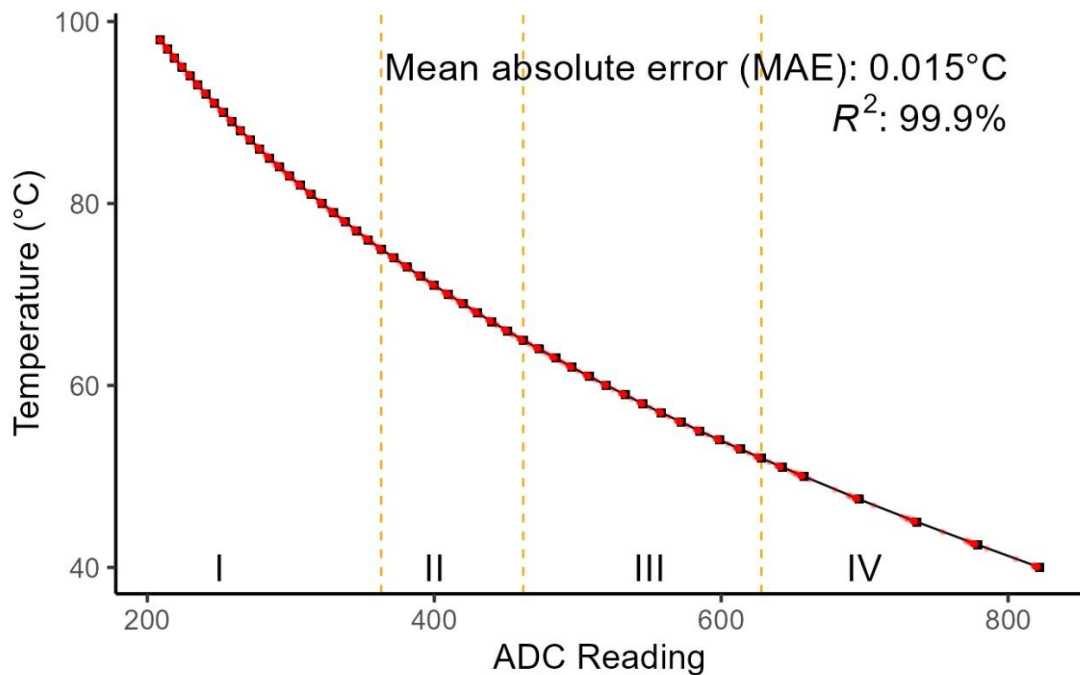
### **3.10 Disponibilidade do projeto**

Todos os arquivos necessários para reproduzir os equipamentos apresentados neste trabalho estão pública e gratuitamente disponíveis no GitHub (<https://github.com/teodecarvalho/PCRAberta.git>). Esse projeto possui licença aberta Creative Commons (CC Atribuição 4.0), de modo que qualquer usuário é livre para compartilhar ou adaptar para qualquer fim, mesmo que comercial, desde que os devidos créditos sejam atribuídos aos autores.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Termômetro digital**

O termômetro digital desenvolvido através de um termistor e uma placa de Arduino Nano mostrou excelente sensibilidade e precisão, conforme demonstrado na Figura 9. O modelo não-linear apresentou  $R^2$  de 99,9% e erro médio absoluto de  $0,015^\circ\text{C}$ . Neste trabalho, a calibração dos termistores foi facilitada pela disponibilidade de um termociclador comercial preciso. Entretanto, esse grau de precisão não é essencial para os termistores usados no controle de temperatura do termociclador desenvolvido aqui, os quais poderiam também ser calibrados através de uma curva obtida a partir de um termômetro analógico.



**Figura 9:** Curva de calibração do termômetro digital. Os quadrados pretos representam os dados usados na calibração, enquanto os pontos vermelhos indicam os dados usados na validação do instrumento. A curva foi ajustada através de polinômios de terceira ordem aplicados a cada um dos quatro segmentos (I-IV) indicados na figura. O eixo horizontal representa a leitura no conversor analógico-digital (ADC) do Arduino, que varia numa escala de 0 a 1023. O eixo horizontal representa o valor da temperatura no bloco do termociclador comercial usado para calibração.

## 4.2 Termociclador

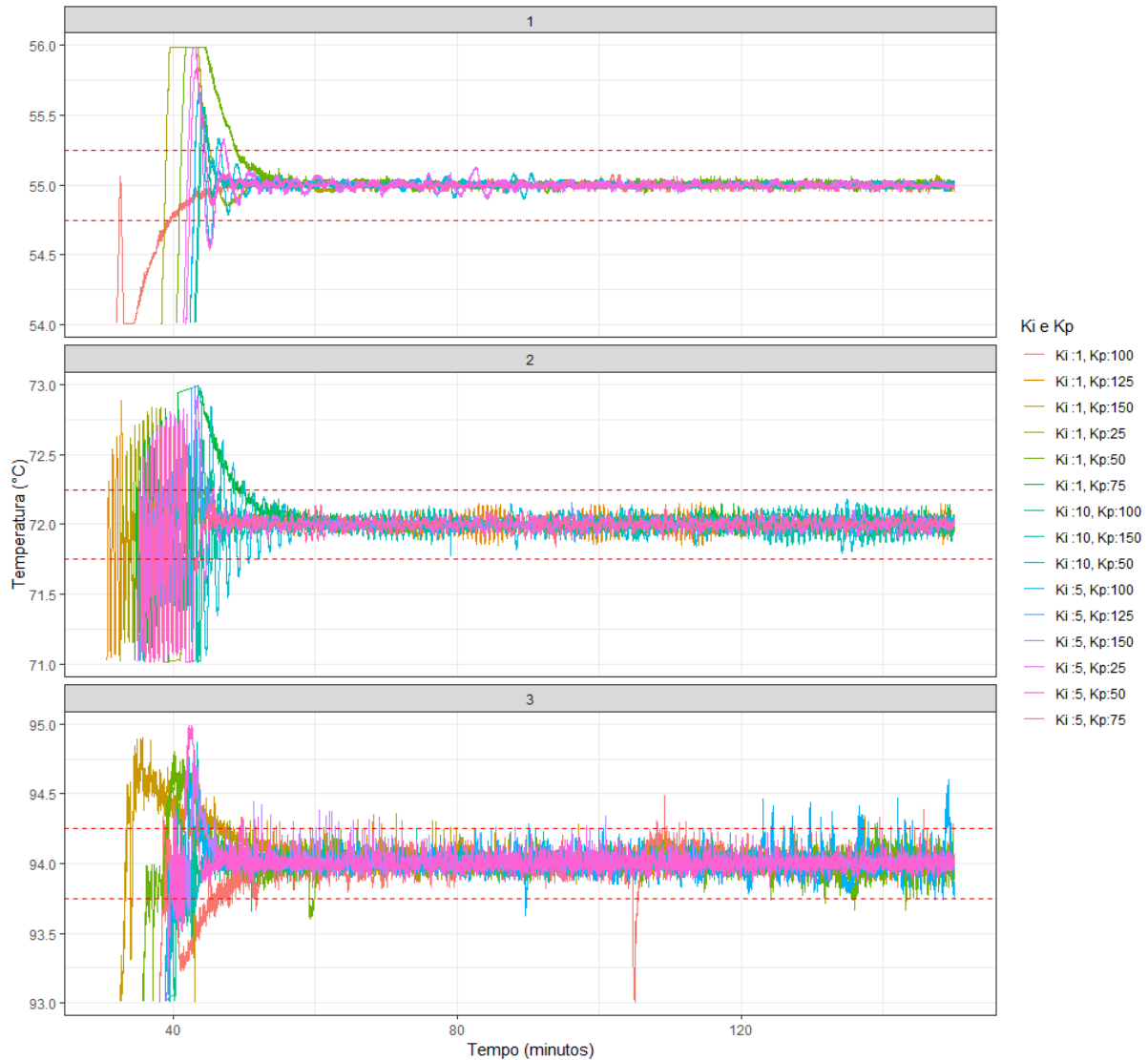
### 4.2.1 Seleção de parâmetros para o controlador PI

O sistema de controle de temperatura adotado neste trabalho apresentou boa estabilidade, independentemente das combinações de  $K_p$  (componente proporcional) e  $K_i$  (componente integrativa) utilizadas, com uma influência mínima nas oscilações de temperatura (Figura 10). Em todos os três recipientes (destinados à desnaturação, ao anelamento e à extensão), a temperatura do sistema sempre convergiu para a desejada em cada etapa do ciclo, permanecendo suficientemente estável para a execução da reação de PCR.

Apesar de não haver uma combinação de parâmetros claramente superior em relação às demais testadas, optou-se pelos seguintes valores de  $K_p$  e  $K_i$  na operação do termociclador: 100 e 5 para o recipiente destinado à desnaturação; 50 e 5 para o anelamento;

75 e 5 para a extensão. Nos testes subsequentes, esses valores resultaram em uma convergência consistente para a temperatura desejada, indicando a eficácia do sistema de controle projetado, assegurando estabilidade e precisão necessárias para o funcionamento adequado do termociclador.

Uma limitação importante da atual configuração desse termociclador é o tempo necessário para as temperaturas estabilizarem inicialmente. Conforme é possível avaliar na Figura 10, apenas a partir de aproximadamente uma hora após o aparelho ser ligado, a temperatura estabiliza nos valores desejados. Somente a partir de então, a PCR pode ser iniciada. Esse tempo pode ser bastante reduzido se forem introduzidas resistências auxiliares de maior potência para acelerar o aquecimento inicial do aparelho. Entretanto, para manter a simplicidade do projeto, optou-se por não incorporar essa função na atual versão deste equipamento, apresentada neste trabalho.



**Figura 10:** Calibração das temperaturas para as diferentes etapas do BOX-PCR com diferentes valores de  $K_p$  e  $K_i$ .

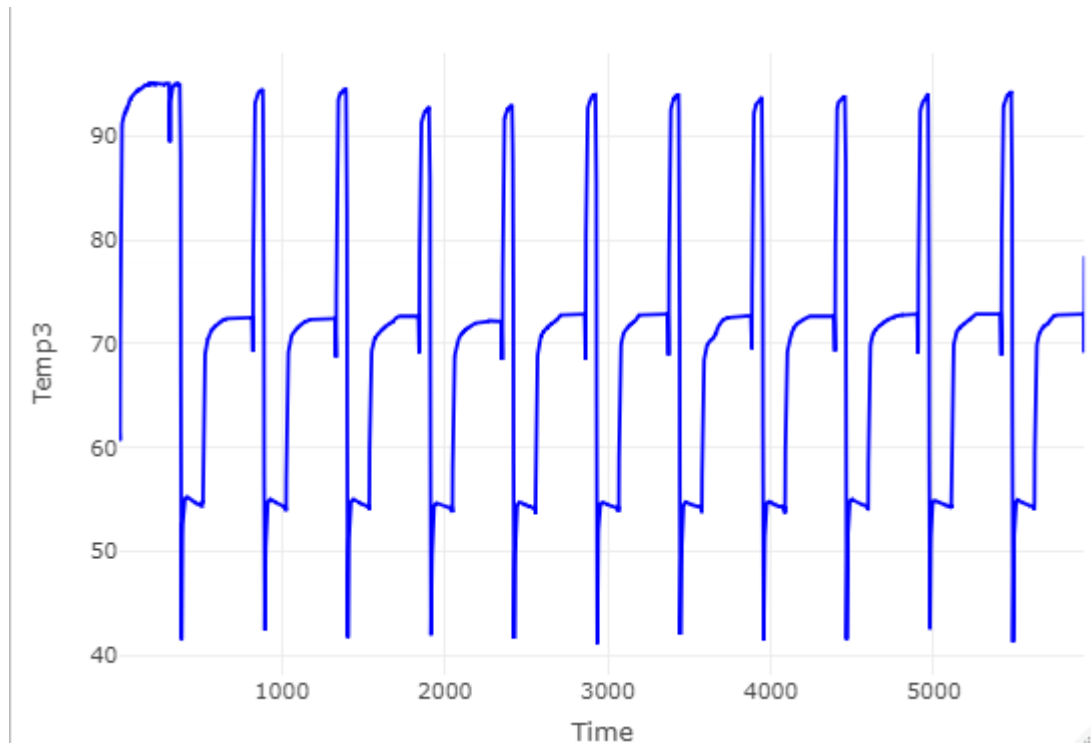
Kadja *et al.*, 2022 desenvolveram um termociclador de baixo custo a partir de um bloco metálico e uma tampa aquecedora provenientes de um termociclador antigo. Para a reação de qPCR, o uso de um controle PID tradicional implicaria alternar rapidamente entre os pontos de ajuste de temperatura e fazer o sistema reagir de acordo. Isso não seria eficaz devido ao tempo necessário para que o sistema alcance a estabilização após cada alteração na temperatura. Para superar essa limitação, um novo sistema de controle de temperatura foi desenvolvido, denominado de Controlador PID Seletivo Progressivo (PSPC). Esse método permite controlar a temperatura de forma mais eficaz, levando em consideração o atraso de tempo prolongado, garantindo assim que a etapa de PCR, que normalmente deve ser concluída em 30 segundos ou menos, seja realizada de maneira adequada. O PSPC é uma abordagem que visa otimizar o controle térmico em sistemas com atrasos de tempo

significativos, como o ciclo térmico da qPCR. No caso do trabalho aqui desenvolvido, como a técnica de BOX-PCR requer períodos maiores de tempo em cada ciclo, não foi necessário o desenvolvimento de um novo sistema de controle ou adoção do PSPC. O controlador do tipo PI foi eficiente em manter a temperatura desejada próximo da temperatura alvo, além de ser de fácil utilização.

#### **4.2.2 Capacidade de ciclagem das temperaturas do termociclador**

Em protótipos prévios desse termociclador, sem resfriamento ativo das amostras, observou-se que havia uma convergência muito lenta da temperatura, especialmente na transição entre a desnaturação e o anelamento. Para mitigar esse problema, acrescentou-se uma etapa de resfriamento das amostras por imersão em água à temperatura ambiente por 5 segundos, após a etapa de desnaturação. Por essa razão, é possível observar na Figura 11 que a temperatura interna do microtubo é rapidamente abaixada após a desnaturação (95°C), convergindo rapidamente para a temperatura-alvo na etapa de anelamento (53°C). Além disso, foi observado a necessidade de alterações nos tempos do anelamento e da extensão, sendo adicionado 1 minuto de transição em cada etapa para atingir a temperatura desejada. A curva de temperatura possui baixas flutuações em cada etapa do ciclo de PCR, o que é requerido para reações em que a precisão é fundamental. O mesmo resultado de flutuações reduzidas durante o ciclo foi obtido por Kadja *et al.* (2022).

A necessidade de incluir esses tempos de transição entre etapas do ciclo, além do período de 60 minutos iniciais para estabilização da temperatura é uma desvantagem desse termociclador em relação ao comercial. O tempo da reação do BOX-PCR no termociclador de baixo custo é de, aproximadamente, 6 horas. Já para o termociclador padrão, esse tempo é de 4 horas e 30 minutos.



**Figura 11:** Curva de temperatura do BOX-PCR em 10 ciclos.

Outro ponto a ser levado em consideração na estabilidade da temperatura é a combinação de água com uma película de óleo mineral nos recipientes de vidro. Isso foi um método eficiente para evitar a oscilação de temperatura, visto que as temperaturas de todos os três recipientes permaneceram estáveis o suficiente para realizar a reação da PCR. Esse resultado foi semelhante ao obtido por Chan *et al.*, 2016.

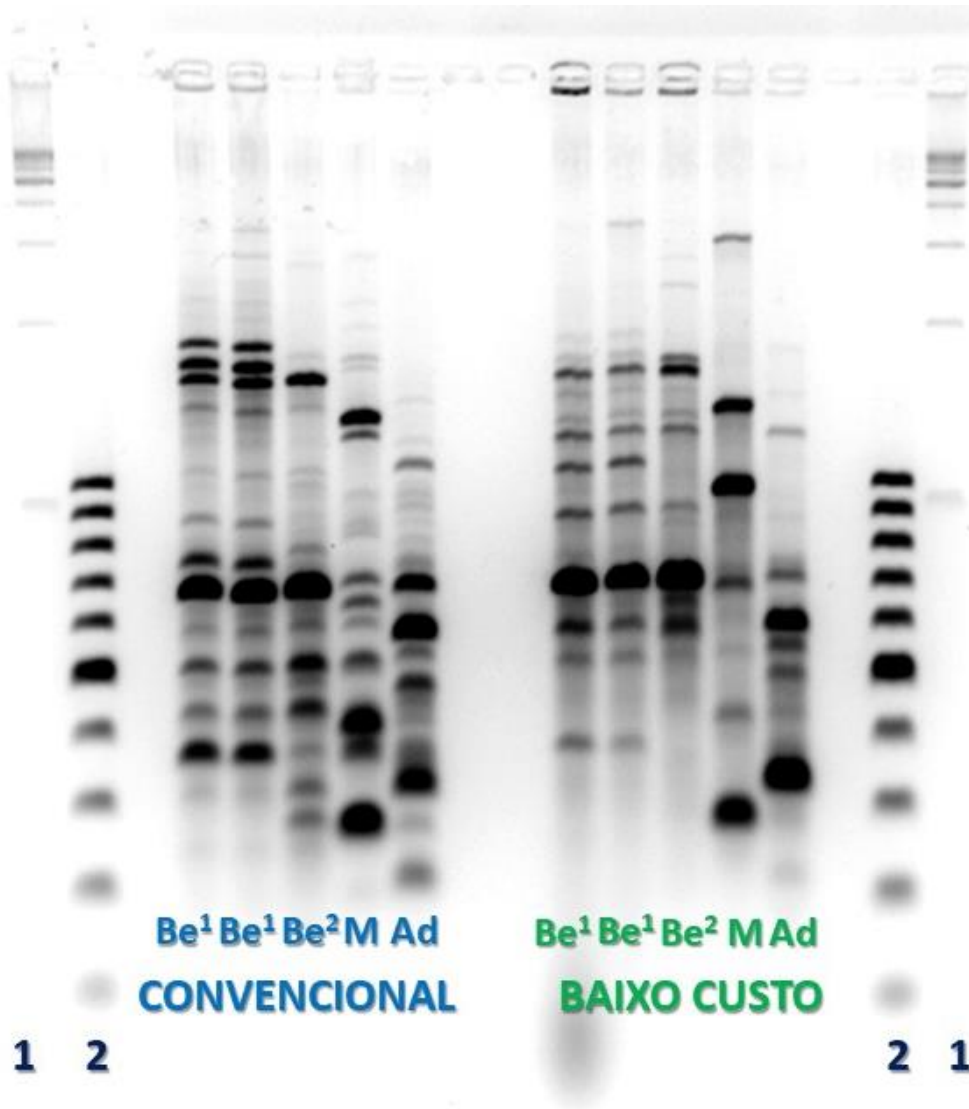
#### **4.2.3 Amplificação de fragmentos de DNA por BOX-PCR no termociclador de baixo custo**

O termociclador de baixo custo desenvolvido neste trabalho foi capaz de realizar com êxito a amplificação dos fragmentos de DNA por meio da técnica de BOX-PCR. No primeiro objetivo testado, em que foi avaliado se os padrões de bandas obtidos por essa técnica seriam capazes de separar espécies e estirpes dentro do gênero *Bradyrhizobium* e de outros dois gêneros (*Mesorhizobium* e *Azorhizobium*) de bactérias fixadoras de N nodulíferas em leguminosas, observou-se que, embora os padrões de bandas sejam distintos entre os dois equipamentos testados, o BOX-PCR foi capaz de separar todas as estirpes tanto no termociclador comercial quanto naquele desenvolvido neste trabalho (Figura 12).



A estirpe SEMIA 5019 (*B. elkanii*) foi feita em duplicata em ambos termocicladores, sendo possível observar que o padrão de bandas manteve-se o mesmo dentro de cada aparelho (termociclador comercial ou o aqui desenvolvido) para a mesma rodada. Assim, foi possível fazer a correta separação entre espécies diferentes dentro do mesmo gênero, estirpes diferentes dentro da mesma espécie (*B. elkanii*) e também entre gêneros diferentes. Considerando a aplicação proposta desse termociclador para detecção de contaminantes, que na prática geralmente são de espécies distintas em relação ao organismo-alvo, esses resultados são bastante satisfatórios e promissores.

É importante destacar que uma importante limitação da análise de BOX-PCR é a falta de reprodutibilidade dos padrões de bandas obtidos devido a múltiplos fatores como o equipamento utilizado, a composição dos reagentes, condições de eletroforese, entre outros (Jena *et al.*, 2021). Assim, a comparação entre perfis de bandas deve ser feita para amostras submetidas às mesmas condições. Desse modo, é importante que para a aplicação aqui proposta, o usuário possua amostras confiáveis e puras dos organismos alvos para serem utilizadas como referências para análise do padrão de bandas resultante da análise dos bioinsumos. Durante a execução desses ensaios, verificamos que a repetição de ciclos de congelamento e descongelamento de amostras de referência resultam na degradação do material genético e no insucesso da reação da análise de BOX-PCR. Assim, a divisão do material de referência original em múltiplas alíquotas de pequeno volume foi necessária para evitar a degradação do material genético pelo uso do mesmo material em múltiplas análises.



**Figura 12:** Perfil de bandas por eletroforese em gel de agarose das amostras de PCR do termociclador convencional e do de baixo custo entre diferentes gêneros. Os números 1 e 2 indicam os marcadores de 1 kb e 100 bp, respectivamente. As siglas Be<sup>1</sup> e Be<sup>2</sup> são das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, respectivamente. As siglas M e Ad são das estirpes UFLA 01-765 e UFLA 1-100, respectivamente.

Resultados semelhantes foram observados em diferentes estudos que desenvolveram termocicladores de baixo custo para a amplificação de fragmentos de DNA em diferentes abordagens como qPCR (Kadja *et al.*, 2023), PCR (Oliveira *et al.*, 2021) e RT-PCR (Chan *et al.*, 2016).

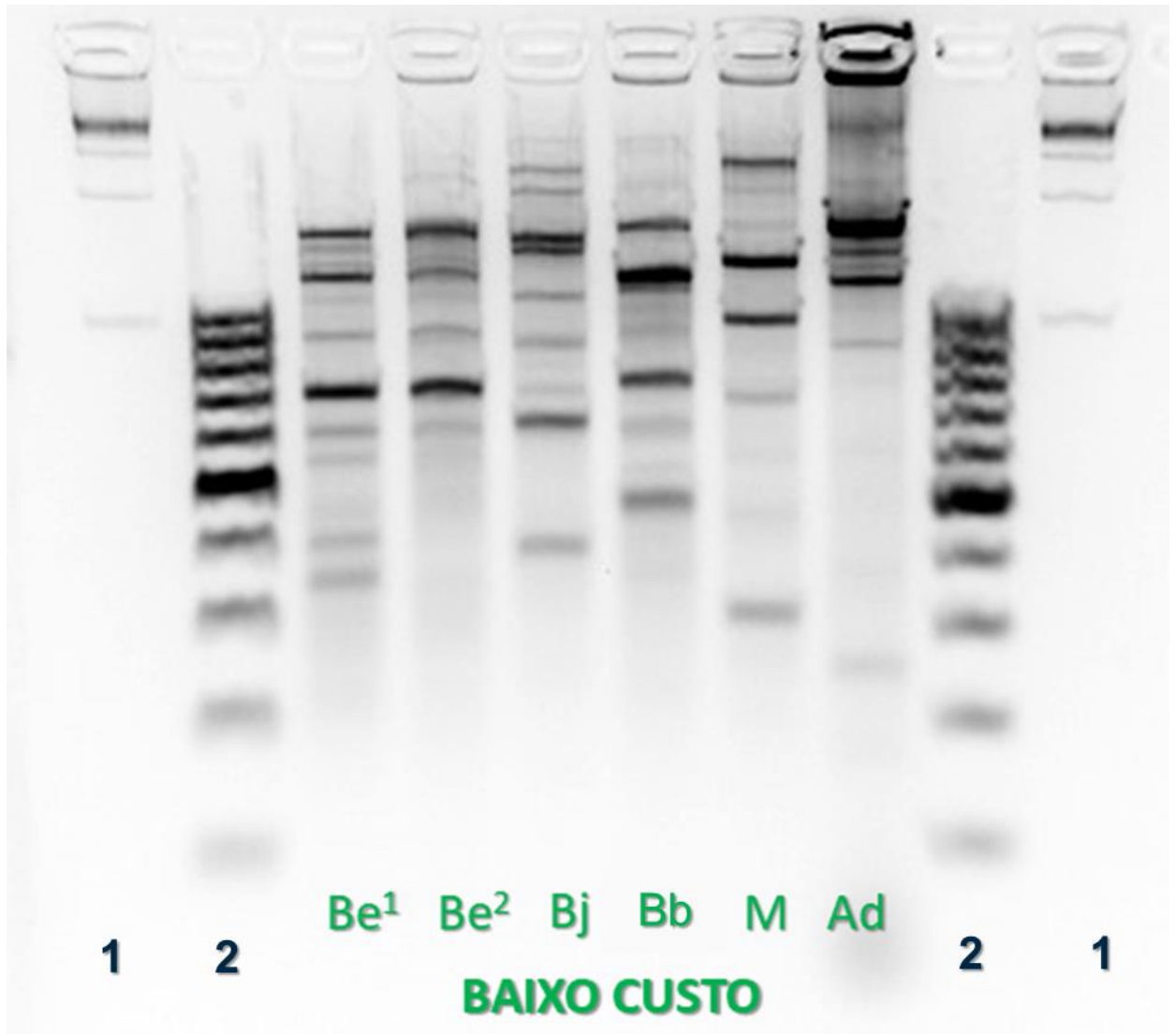
Os resultados obtidos até aqui são promissores pois demonstram a capacidade do termociclador de baixo custo em amplificar fragmentos de DNA e detectar variações genéticas entre espécies do mesmo gênero e entre gêneros distintos. O uso da técnica de BOX-PCR no termociclador de baixo custo representa uma alternativa viável e econômica para a realização de análises de possíveis contaminações em lotes específicos de bioinsumos

produzidos “*on farm*” com precisão e confiabilidade, sendo uma forma de mitigar potenciais prejuízos econômicos para os produtores desses bioinsumos.

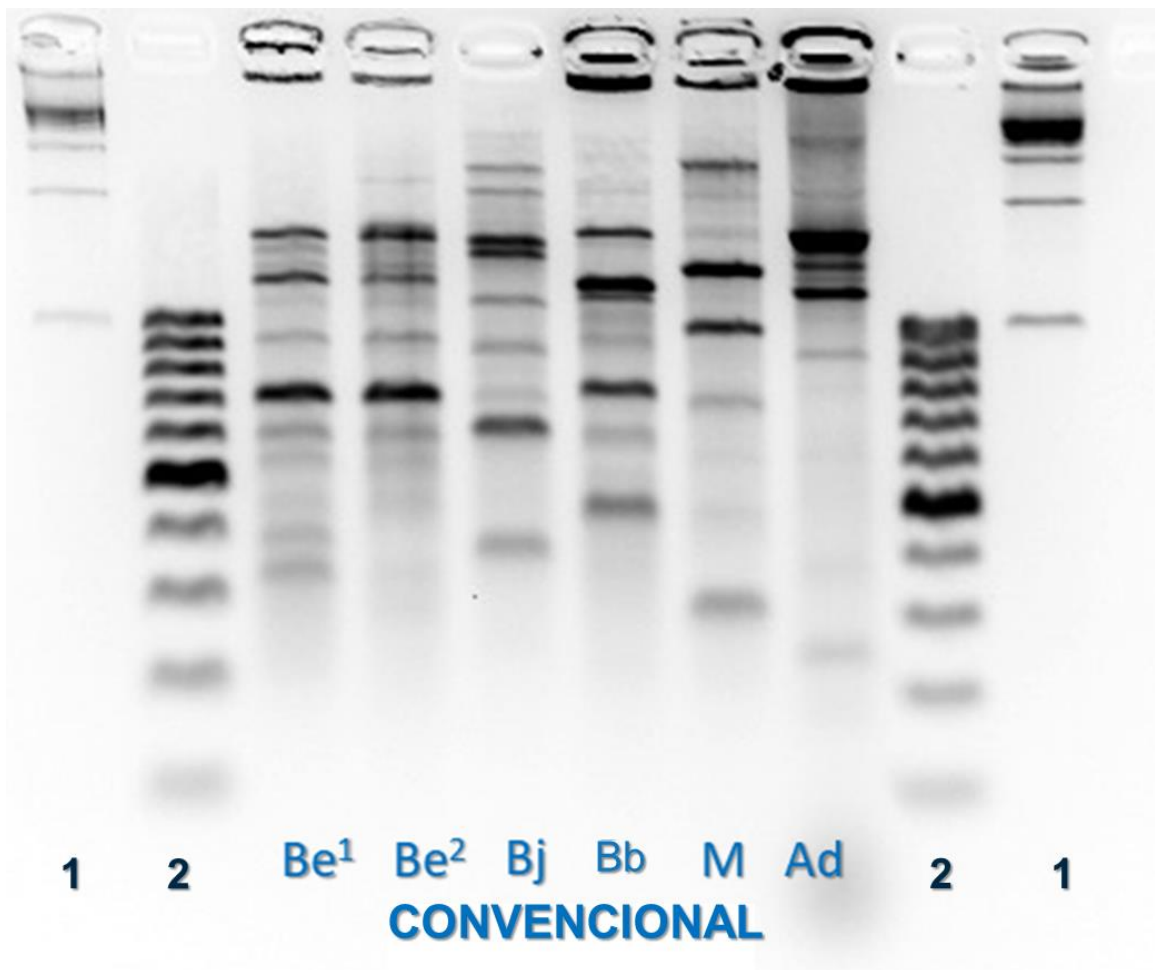
O sucesso obtido pelo termociclador de baixo custo tem implicações significativas, especialmente para pequenos laboratórios regionais, instituições com orçamento limitado, *startups* e associação de produtores. Isso porque a licença aberta do código e do hardware desenvolvido neste trabalho incentiva a adaptação do equipamento de acordo com as necessidades dos usuários. Através da licença aberta, qualquer usuário que tenha um treinamento sobre o uso dessa ferramenta será capaz de executar tais análises. Dessa forma, é possível adquirir um equipamento de igual precisão, eficácia e confiabilidade dos modelos comerciais, a um custo substancialmente mais baixo.

#### **4.3 Separação de bandas oriundas do BOX-PCR na cuba e fonte de eletroforese de baixo custo**

Como a eletroforese em gel de agarose é uma etapa essencial para a análise de BOX-PCR, neste trabalho foi também desenvolvida uma fonte e uma cuba de eletroforese bastante simplificada e com custo muito inferior ao de equipamentos comerciais. Houve a correta discriminação dos perfis de bandas no gel de eletroforese em ambos os equipamentos (comercial e desenvolvido nesse trabalho), resultando em perfis distintos para os diferentes isolados. A clareza da separação das bandas proporcionou uma análise precisa das amostras, viabilizando a identificação das variações genéticas. O resultado obtido no aparelho de baixo custo (Figura 13) é indistinguível do resultado do equipamento convencional (Figura 14), sendo assim uma ótima opção para reduzir os custos nesse tipo de análise.



**Figura 13:** Separação de bandas por eletroforese em gel de agarose no equipamento de baixo custo. Os números 1 e 2 indicam os marcadores de 1kb e 100 bp, respectivamente. As siglas Be<sup>1</sup> e Be<sup>2</sup> são das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, respectivamente. As siglas Bj, Bb, M e Ad são das estirpes UFLA 06-37, UFLA 3-321, UFLA 01-765 e UFLA 1-100, respectivamente.



**Figura 14:** Separação de bandas por eletroforese em gel de agarose no equipamento convencional. Os números 1 e 2 indicam os marcadores de 1kb e 100 bp, respectivamente. As siglas Be<sup>1</sup> e Be<sup>2</sup> são das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, respectivamente. As siglas Bj, Bb, M e Ad são das estirpes UFLA 06-37, UFLA 3-321, UFLA 01-765 e UFLA 1-100, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lagos-Suasetta *et al.*, (2020), o qual utilizou a técnica da eletroforese de campo pulsado, que é uma variação da eletroforese convencional. Através da mudança periódica e abrupta na direção do campo elétrico, esse método permite a separação de moléculas de DNA muito grandes (Schwartz *et al.*, 1983). Lagos-Suasetta *et al.*, (2020) utilizou uma câmara de eletroforese padrão comercial, peças impressas em 3D, servo motor e uma eletrônica simples. O equipamento foi capaz de separar moléculas de DNA de maneira eficiente e precisa com um custo de, aproximadamente, U\$850,00. Apesar do equipamento em questão ser preciso e capaz de gerar resultados semelhantes ao padrão comercial, ainda apresenta um custo substancial quando comparado ao sistema de eletroforese desenvolvido neste estudo.

Já Gutzweiler *et al.* (2020) apresentou um sistema microfluídico aberto para a condução da separação de moléculas de DNA via eletroforese de alta sensibilidade e baixo custo. O sistema foi montado com dois reservatórios opostos de volumes de 2 a 4  $\mu\text{L}$  e uma linha feita de gel como canal de separação, com o objetivo de interconectar os reservatórios. A amostra foi colocada na linha por meio de gotículas e, para evitar a evaporação, estruturas aquosas com óleo mineral foram colocadas para cobrir as amostras. O campo elétrico foi aplicado por meio do contato de pinos em óleo dos canais microfluídicos. Essa nova abordagem apresentou resultados satisfatórios na separação de fragmentos de DNA variando de 100 - 1000 pares de bases de comprimento.

Um diferencial importante da abordagem apresentada nesse trabalho é a sua simplicidade e baixo custo, representando um avanço na acessibilidade de técnicas laboratoriais. Além disso, a facilidade de manuseio e os custos reduzidos da cuba e fonte de eletroforese têm implicações importantes para pequenos laboratórios regionais e para instituições com recursos limitados. Ao reduzir as barreiras financeiras, essa inovação pode democratizar o acesso a técnicas avançadas de biologia molecular, permitindo uma inclusão de pesquisadores, instituições, laboratórios regionais e produtores rurais na análise genética de microrganismos.

#### **4.4 Imageamento de géis de agarose**

Nesse trabalho os géis foram imageados através de um transiluminador padrão. Entretanto, há diversas opções de equipamentos de baixo custo disponíveis para o imageamento de géis. Motohashi (2019) desenvolveu dois sistemas de detecção de gel de agarose DNA simples, de baixo custo, altamente sensíveis e com utilização de corantes de DNA não mutagênicos (Midori Green Direct, Novel Juice, Safelook Load-Green, SYBR Safe, EZ-Vision e Safelook Load-White). O primeiro sistema foi capaz de detectar fragmentos de DNA com a mesma sensibilidade de um transiluminador ultravioleta (UV) padrão e o segundo sistema apresentou sensibilidade maior quando comparado ao transiluminador padrão. O custo do hardware do sistema de LED ciano e filtro de emissão foi de, aproximadamente, US\$300. Para o sistema baseado em radiação ultravioleta o custo foi em torno de US\$730, possuindo custos menores do que um transiluminador UV (> US\$1.000).

Cunha *et al.* (2020) projetaram um dispositivo de detecção de DNA/RNA de baixo custo com capacidade de obtenção de dados qualitativos e semi-quantitativos por meio da

análise de gel de agarose. Com o uso de tecnologia e material de fácil acesso, como LEDs, impressão 3D, smartphone e software personalizado, os autores foram capazes de desenvolver um equipamento passível de substituir o transiluminador UV padrão. O aparelho é capaz de atuar na faixa de absorção da luz visível dos corantes de DNA/RNA comumente utilizados em análises moleculares (SYBR Green®, GelRed® e brometo de etídio) e possui dois softwares operacionais. Esse equipamento foi capaz de substituir o transiluminador UV convencional e foi capaz de detectar bandas de DNA coradas com os três corantes utilizados, apresentando um custo médio de US\$53,46, sem contabilizar o custo do smartphone que é significativamente mais barato do que os equipamentos padrões.

Em razão de trabalhos como esses, nós não optamos por desenvolver uma metodologia própria para esse trabalho, utilizando o equipamento padrão para o imageamento dos géis.

#### **4.5 Custos dos equipamentos**

Os equipamentos aqui desenvolvidos para análises moleculares com foco em bioinsumos produzidos “*on farm*” possuem preço bem mais acessível quando comparados àqueles comerciais, conforme Figura 15. Isso é particularmente importante em regiões com recursos limitados e em instituições com orçamentos restritos, além de ser uma oportunidade para *startups* que se interessem pelo desenvolvimento desta tecnologia. Outra possibilidade é o desenvolvimento de laboratórios regionais ou até mesmo locais (na fazenda), de modo que possam realizar essa análise de forma rotineira.

Outra aplicação possível desses equipamentos, desde que as devidas modificações sejam efetuadas para aumentar o nível de segurança, é sua aplicação em laboratórios de ensino médio supervisionada por profissionais qualificados. Tanto a confecção do aparelho quanto sua utilização podem ser estratégias didáticas interessantes para introduzir tópicos relacionados às aplicações da robótica, eletrônica, técnicas moleculares, entre outros.

<b>TERMOCICLADOR</b>			
<b>Material</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Custo</b>	
Arduino Nano	2	R\$	40,00
Becker	4	R\$	68,00
Fonte Chaveada 12V	1	R\$	50,00
Mosfets	3	R\$	48,00
Placa de Acrílico	3	R\$	60,00
Resistências	3	R\$	30,00
Servo Motor SG90	2	R\$	24,00
Termistores	5	R\$	59,95
Outros componentes eletrônicos	-	R\$	20,00
<b>TOTAL</b>		<b>R\$</b>	<b>399,95</b>

<b>CUBA E FONTE DE ELETROFORESE</b>			
<b>Material</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Custo</b>	
Dimmer	1	R\$	29,90
Fio de Platina	1		
Placa de Acrílico	1	R\$	30,00
Ponte Retificadora	1	R\$	5,00
<b>TOTAL</b>	-	<b>R\$</b>	<b>64,90</b>

**Figura 15:** Custos dos componentes dos equipamentos de baixo custo desenvolvidos.

## **5. PROPOSTA DE PROTOCOLO INICIAL PARA ANÁLISE DE BIOINSUMOS POR BOX-PCR**

A partir dos resultados apresentados, nós mostramos a viabilidade de uso dessa aparelhagem de menor custo para a aplicação da técnica de BOX-PCR na distinção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas dentro da mesma espécie, gênero ou de gêneros distintos. Esses testes foram realizados como uma prova de conceito da viabilidade do uso dessa técnica para análise da qualidade de bioinsumos produzidos on-farm, uma vez que o menor custo desses aparelhos facilita a montagem de laboratórios locais, até mesmo na escala da propriedade rural, para o monitoramento desses bioinsumos. Essa abordagem ainda precisa ser testada e validada em condições de campo, mas os resultados aqui apresentados são um primeiro passo nesse sentido.

Para utilização da abordagem aqui apresentada para análise de bioinsumos, propomos a seguinte estratégia simplificada:

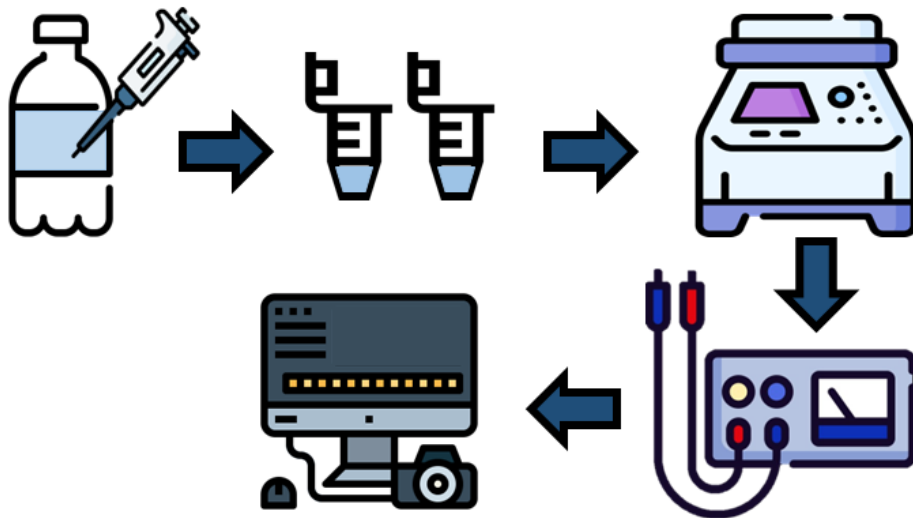


1. O produtor deverá manter um estoque puro do organismo de interesse que será utilizado como referência para comparações. Esse estoque deve ser armazenado em pequenas quantidades (10  $\mu$ L) em microtubos e armazenado em geladeira, conforme descrito neste trabalho.
2. Uma alíquota de 10  $\mu$ L do bioinsumo será coletada através de uma tira de celulose (Mason; Botella, 2020), papel de celulose (Zou *et al.*, 2017) ou por pipetas automáticas impressas em 3D (Baden *et al.*, 2015) e colocadas em microtubos.
3. A reação de PCR deve ser realizada conforme a metodologia utilizada neste trabalho, incluindo a amostra de referência e o bioinsumo a ser analisado.
4. Um gel de agarose 2% (40 mL de TAE 1x e 0,8g de agarose) deve ser feito para separar os fragmentos por tamanho.
5. Em um parafilme, pipetar 6  $\mu$ L do corante a ser utilizado sob 4  $\mu$ L da amostra de PCR em que o DNA genômico utilizado foi o da solução proveniente do passo 1. Misturar bem (pipetar no parafilme) e colocar no primeiro poço. Essa será a referência/padrão a ser comparado.
6. No mesmo parafilme, pipetar 6  $\mu$ L do corante a ser utilizado sob 4  $\mu$ L das amostras de PCR do bioinsumo a ser analisado. Misturar bem (pipetar no parafilme) e colocar nos demais poços.
7. Colocar o gel para correr por 2 horas e 30 minutos (não permitir que o conteúdo do gel caia sobre o TAE 1x da corrida).
8. O gel deverá ser fotodocumentado e a pureza do bioinsumo avaliada pelo grau de coincidência entre o padrão de bandas da referência utilizada e aquele das amostras analisadas. A contaminação será detectada pela presença de bandas adicionais que não ocorrem na estirpe referência/padrão.

## Armazenamento da estirpe referênci



## Análise molecular do bioinsumo



## Análise de bandas – referência x bioinsumo

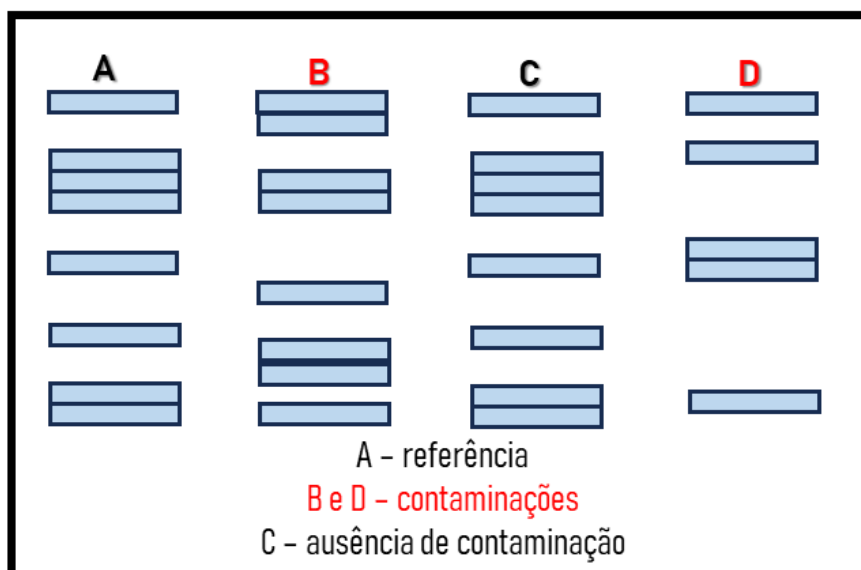


Figura 16: Esquema do protocolo inicial para análises de bioinsumos. Do autor, 2023.

## 6. DESAFIOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Um dos principais pontos a ser considerado neste projeto é a necessidade de criação de uma interface mais amigável ao usuário. Os equipamentos aqui desenvolvidos podem ser considerados como Mínimo Produto Viável (MVP) e seu foco está nos aspectos técnicos para atingir os objetivos desejados. Embora a atual versão tenha se mostrado efetiva quanto ao objetivo para que foi projetada, tornar a interface mais simples e fácil de usar, além de fazer ajuste para aumentar a segurança do usuário é fundamental. Isso pode envolver a simplificação do design, a consideração das necessidades e experiências dos usuários finais e também a inclusão de elementos intuitivos.

A incorporação de ferramentas que indiquem a convergência das temperaturas, bem como a indicação do final do ciclo através de um display LCD podem melhorar significativamente o processo de análise dos ciclos de temperatura. Esses serão os próximos passos na melhoria do termociclador de baixo custo.

Quanto à segurança, é de extrema importância que o equipamento de eletroforese seja projetado e desenvolvido com cuidado para evitar riscos de choque elétrico. É válido ressaltar que os equipamentos desenvolvidos são apenas uma prova de conceito para o uso da técnica de BOX-PCR no controle de qualidade de bioinsumos. Portanto, é necessário tomar o devido cuidado devido ao risco de choque elétrico. Os indivíduos interessados em replicar os resultados aqui apresentados deverão tomar as devidas precauções de segurança.

A disponibilidade de reagentes é outra questão importante. A restrição de acesso aos reagentes utilizados para as análises moleculares apenas para instituições de pesquisa e universidades pode limitar o progresso científico e tecnológico, como no caso do presente estudo. Uma alternativa seria a distribuição/comercialização de kits prontos com microtubos contendo todos os reagentes necessários para a PCR. O intuito é que se possa facilitar a disponibilização desses insumos para os usuários dessa tecnologia, tornando-a acessível a um público mais amplo. Startups ou empresas interessadas nessa tecnologia podem desempenhar um papel importante na viabilização desses reagentes.

Em relação à impressão 3D, embora esse tipo de equipamento tenha se tornado bastante acessível, ainda pode haver interessados sem acesso a essa tecnologia. Nesse caso, sugere-se a contratação do serviço de empresas que oferecem impressão 3D de peças sob encomenda a preços acessíveis. Isso permite que os usuários enviem seus projetos para

serem impressos profissionalmente, eliminando a necessidade de investimento/experiência em impressão 3D.

A perspectiva futura é que com a disponibilização de licenças abertas para esses aparelhos, a comunidade usuária possa contribuir para melhorias e alterações que facilitem sua adoção pela comunidade em geral, de forma a atender as necessidades específicas dos usuários. Além disso, empresas interessadas podem desenvolver produtos e equipamentos com base nesses designs. Essa colaboração aberta tem o potencial de impulsionar avanços significativos e promover a disseminação mais ampla de tecnologias eficazes e de baixo custo.

## 7. CONCLUSÕES

O trabalho aqui realizado representa um avanço na acessibilidade de técnicas laboratoriais essenciais a um público mais amplo, pois há maior simplicidade na obtenção dos materiais necessários. Além disso, a facilidade de manuseio e os custos reduzidos dos equipamentos desenvolvidos têm implicações importantes para pequenos laboratórios regionais e para instituições com recursos limitados. Ao reduzir as barreiras financeiras, essa inovação pode democratizar o acesso a técnicas avançadas de biologia molecular, permitindo uma inclusão de pesquisadores, instituições, laboratórios regionais e produtores rurais na análise genética de microrganismos. O desenvolvimento bem-sucedido de equipamentos de baixo custo para análises moleculares para o controle de qualidade de bioinsumos produzidos “*on farm*” representa um marco significativo na busca por acessibilidade e democratização da pesquisa científica e também de análises laboratoriais que são realizadas apenas em universidades e centros de pesquisa. Os equipamentos desenvolvidos provaram ser altamente eficazes, apresentando desempenho comparável aos equipamentos comerciais disponíveis no mercado.

Embora estes MVPs (Mínimo Produto Viável) tenham atingido resultados promissores, é fundamental reconhecer que ainda é um estágio inicial de desenvolvimento, e existem áreas que requerem aprimoramentos contínuos, como design, segurança e acessibilidade de reagentes, mesmo que os resultados atingidos foram promissores.

É importante destacar que esse projeto está sob uma licença livre, de modo a incentivar a comunidade a explorar e aprimorar ainda mais essa tecnologia. Isso permite que pesquisadores, profissionais e usuários interessados nessa tecnologia (i.e. produtores) possam adaptar e personalizar esses equipamentos para atender as necessidades específicas de seus possíveis cenários de aplicação.

## REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, E.; KAŁUŻNA, M.; JANSE, J.D.; SOBICZEWSKI, P.; HELALI, F.; LAMICHHANE, J.R.; RHOUMA, A. Phenotypic and genetic characterization of *Pseudomonas syringae* strains associated with the recent citrus bacterial blast and bacterial black pit epidemics in Tunisia. **Plant Pathology**, v. 66, p. 1081-1093, 2017.
- ACANTO, R.; CASTOR, J.; LANGCOY, M.G. Assessment of gDNA extracted from *Staphylococcus aureus* isolate by polymerase chain reaction, agarose gel electrophoresis, and spectrophotometric assay. **JPAIR Multidisciplinary Research**, v. 44, n. 1, p. 110–128, 2021.
- ALI, A.S.; ZANZINGER, Z.; DEBOSE, D.; STEPHENS, B. Open-Source Building Science Sensors (OSBSS): A low-cost Arduino-based platform for long-term indoor environmental data collection. **Building and Environment**, v. 100, p. 114-126, 2016.
- ASTROM, K.J. **PID controllers: theory, design, and tuning**. The International Society of Measurement and Control, 1995.
- BADEN, T.; CHAGAS, A.M.; GAGE, G.J.; MARZULLO, T.C.; PRIETO-GODINO, L.L.; EULER, T. Open Labware: 3-D Printing Your Own Lab Equipment. **PLOS Biology**, v. 13, n. 3, 2015.
- BANZI, M.; SHILOH, M. **Primeiros Passos com o Arduino – 2ª Edição: A plataforma de prototipagem eletrônica open source**. Novatec Editora, 2015.
- BARBOSA, L.P.; COSTA, P.F.; RIBEIRO, P.R.A.; RUFINI, M.; GUIMARÃES, A.A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic Efficiency and Genotypic Characterization of Variants of *Bradyrhizobium* spp. in Commercial Inoculants for Soybeans. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.41, 2017.
- BOCATTI, C. R. et al. Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasiliense* produced “on farm” reveals high contamination with non-target microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 267-280, 2022.
- BOGLIETTI, A. et al. Different PWM modulation techniques indexes performance evaluation. In: **ISIE'93-Budapest: IEEE International Symposium on Industrial Electronics Conference Proceedings**. IEEE, p. 193-199, 1993.
- BORASE, R.P.; MAGHADE, D.K.; SONDKAR, S.Y. et al. A review of PID control, turning methods and applications. **International Journal of Dynamics and Control**, v. 9, p. 818-827, 2021.
- BORBA, M.P.; BALLARINI, A.E.; WITUSK, J.P.D. et al. Evaluation of BOX-PCR and REP-PCR as Molecular Typing Tools for Antarctic *Streptomyces*. **Current Microbiology**, v. 77, p. 3573-3581, 2020.

BRASIL. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia. **Microrganismos promotores do crescimento de plantas visando à sustentabilidade agrícola e à responsabilidade ambiental**. Nota Técnica sobre legislação de bioinsumos. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Instrução Normativa no. 13, de 24 de marco de 2011**. [S.l.] Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view>. Acesso em 6 out. de 2023.

BURPO, F.J. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. **Biochemistry**, v. 218, n. 11, 2001.

CALLAHAN, B.J.; WONG, J.; HEINER, C.; OH, S.; THERIOT, C.M.; GULATI, A.S.; MCGILL, S.K.; DOUGHERTY, M.K. High-throughput amplicon sequencing of the full-length *16S* rRNA gene with single-nucleotide resolution. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 18, p. 103, 2019.

CHAN, K.; SCHILLEREFF, D.N.; BAAS, A.C.; CHADWICK, M.A.; MAIN, B.; MULLIGAN, M.; O'SHEA, F.T.; PEARCE, R.; SMITH, T.E.; VAN SOESBERGEN, A.; TEBBS, E.; THOMPSON, J. Low-cost electronic sensors for environmental research: Pitfalls and opportunities. **Progress in Physical Geography: Earth and Environment**, v. 45, n. 3, p. 305–338, 2021.

CHAN, K.; WONG, P.Y.; YU, P.; HARDICK, J.; WONG, K.Y.; WILSON, S.A.; WU, T.; HUI, Z.; GAYDOS, C.; WONG, S.S. A Rapid and Low-Cost PCR Thermal Cycler for Infectious Disease Diagnostics. **PLOS One**, v. 11, n. 2, 2016.

CHIBEBA, A.M.; PEREIRA, C.S.; ANTUNES, J.E.L. et al. Polyphasic characterization of nitrogen-fixing and co-resident bacteria in nodules of *Phaseolus lunatus* inoculated with soils from Piauí State, Northeast Brazil. **Symbiosis**, v. 80, p. 279-292, 2020.

CHRIST, R.D.; WERNLI, R.L. **Chapter 7—Power and Telemetry**. [S.l.] The ROV Manual, 2nd edition.; Christ, RD, Wernli, RL, Eds, p. 141-161, 2014.

COSTA, E.M. et al. *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 1211-1221, 2017.

CUNHA, E.N., et al. A low-cost smart system for electrophoresis-based nucleic acids detection at the visible spectrum. **PLOS One**, v. 15, n. 10, 2020.

D'AUSILIO, A.A. A low-cost multipurpose lab equipment. **Behavior Research Methods**, v. 44, p. 305–313, 2012.

DALL'AGNOL, A.; NOGUEIRA, M.A. Bioinsumos: a terceira onda da agricultura brasileira. **Canal Rural**, São Paulo, v. 16, 2020.

DAMASE, T.R.; STEPHENS D., SPENCER A. et al. Open source and DIY hardware for DNA nanotechnology labs. **Journal of Biological Methods**, v. 2, 2015.

DAVIS, J.J.; FOSTER, S.W.; GRINIAS, J.P. Low-cost and open-source strategies for chemical separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1638, 2021.

DHANKANI, K.C.; PEARCE J.M. Open-source laboratory sample rotator mixer and shaker, **HardwareX**, v. 1, p. 1–12, 2017.

DRYDEN, M.D.M.; FOBEL, R.; FOBEL, C.; WHEELER, A.R. Upon the shoulders of giants: open-source hardware and software in analytical chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 89, p. 4330-4338, 2017.

EFSTATHIADOU, E.; SAVVAS, D.; TAMPAKAKI, A.P. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, 2020.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Ciência e tecnologia permitem safras recordes de soja nas lavouras brasileiras**. [S.l.] 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/79598649/ciencia-e-tecnologia-permitem-safras-recordes-de-soja-nas-lavouras-brasileiras>. Acesso em 21 abr. de 2023.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on-farm) – Esclarecimentos Oficiais**. [S.l.] 2021. Disponível em: [https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset\\_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false](https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false). Acesso em 1 de nov. de 2022.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil. **Soil Science**, v. 27, n. 3, p. 247, 1929.

GETAHUN, A.; KIROS, S.; DIRIBA, M.; ASSEFA, F. Genetic and metabolic diversities of rhizobacteria isolated from degraded soil of Ethiopia. **Heliyon**, v. 6, n. 12, 2020.

GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 1, 2019.

GUIMARÃES, A.A. et al. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 6726-6773, 2012.

GUTZWEILER, L.; GLEICHMANN, T.; TANGUY, L.; KOLTAY, P.; ZENGERLE, R.; RIEGGER, L. Open microfluidic gel electrophoresis: Rapid and low-cost separation and analysis of DNA at the nanoliter scale. **Electrophoresis**, v. 38, p. 1764-1770, 2017.

HOUNKPE, B.W. et al. HRT Atlas v1. 0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D947-D955, 2021.

JASIUK, I.; ABUEIDDA, D.W.; KOZUCH, C.; PANG, S.; SU, F.Y.; MCKITTRICK, J. An overview on additive manufacturing of polymers. **JOM**, v. 70, n. 3, p. 275-283, 2018.

JENA, R. et al. Efficacy of BOX-PCR fingerprinting for taxonomic discrimination of bifidobacterial species isolated from diverse sources. **3 Biotech**, v. 11, n. 6, p. 270, 2021.

KADJA, T. et al. Low-cost, real-time polymerase chain reaction system for point-of-care medical diagnosis. **Sensors**, v. 22, n. 6, p. 2320, 2022.



- KIM, S.M. et al. Applications of the Open-Source Hardware Arduino Platform in the Mining Industry: A Review. **Applied Sciences**, v. 10, n. 14, 2020.
- KUHNKE, L.M.; REHFELD, J.S.; UDE, C.; BEUTEL, S. Study on the development and integration of 3D-printed optics in small-scale productions of single-use cultivation vessels. **Engineering in Life Sciences**, v. 22, p. 440 – 452, 2022.
- LAGOS-SUSAETA, D.; SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. openPFGE: An open source and low cost pulsed-field gel electrophoresis equipment. **HardwareX**, v. 8, 2020.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Conceitos**. [S.l.] Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>. Acesso em 1 de nov. de 2022.
- MARQUES, A.S.A. et al. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 106-115, 2008.
- MARTINEZ, J.B. Open-source 3D-printed 1000µL micropump. **HardwareX**, v. 3, p. 110-116, 2018.
- MASON, M.G.; BOTELLA, J.R. Rapid (30-second), equipment-free purification of nucleic acids using easy-to-make dipsticks. **Nature Protocols**, v. 15, n. 11, p. 3663-3677, 2020.
- MEYER, M.C. et al. **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2022. 550p.
- MICHEL, D.C. et al. *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 657-664, 2017.
- MOHAMED, M.; JAISWAL, S.K.; DAKORA, F.D. Distribution and correlation between phylogeny and functional traits of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)- nodulating microsymbionts from Ghana and South Africa. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2018.
- MOREIRA, F.M.S. et al. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 197-206, 2006.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- MOREIRA, F.M.S.; SOUSA, P.M. Potencial econômico da inoculação de rizóbios em feijão-caupi na agricultura familiar: um estudo de caso. **Revista Em Extensão**, v. 10, n. 2, 2011.
- MOTOHASHI, K. Development of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis detection systems, and evaluation of non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents. **PLOS One**, 2019.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- OBERLOIER, S.; PEARCE, J.M. General Design Procedure for Free and Open-Source Hardware for Scientific Equipment. **Designs**, v.2, n. 1, 2018.

OLIVEIRA, V.K.; CAMARGO, B.D.; ALEXANDRINO, F. et al. A low-cost PCR instrument for molecular disease diagnostics based on customized printed circuit board heaters. **Biomedical Microdevices**, v. 23, n. 24, 2021.

ONU BRASIL – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Nações Unidas, Brasil, 2022. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em 19 dez de 2023.

PÉREZ-COBAS, A.E.; GOMEZ-VALERO, L.; BUCHRIESER, C. Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 8, 2020.

POMILIO, J. A. **Fontes Chaveadas**. Publicação FEEC 13/95. Campinas: Ed. do Autor, 2014.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. **Molecular Microbial y Ecology Manual**, p.1-26, 1997.

RANGEL, W.M. et al. Draft genome sequence of *Mesorhizobium* sp. UFLA 01-765, a multitolerant, efficient symbiont and plant growth-promoting strain isolated from Zn-mining soil using *Leucaena leucocephala* as a trap plant. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, 2016.

RIBEIRO, P.R.A.; SANTOS, J.V.; COSTA, E.M.; LEBBE, L.; ASSIS, E.S.; LOUZADA, M.O.; GUIMARÃES, A.A.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 212, p. 85-93, 2015.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n.12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, A.F.J.; DINNAS, S.S.E.; FEITOZA, A.F.A. Microbiological quality of bioproducts multiplied on farm in the São Francisco valley: preliminary data. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 34, p. 443, 2020.

SCHWARTZ, D.C. et al. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 189-195, 1983.

STOCCO, P. et al. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1107-1120, 2008.

TIMMUSK, S.; BEHERS, L.; MUTHONI, J.; MURAYA, A.; ARONSSON, A.C. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 49, 2017.

UNESCO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E CULTURA. **Recomendação da UNESCO sobre ciência aberta**. [S.l.] 2021. Disponível em: [https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000379949\\_por](https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000379949_por). Acesso em 17 jan. 2023.

UNESCO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E CULTURA. **Records of the General Conference, 39th session, Paris, 30 October-14 November 2017, v. 1: Resolutions**. 2017. Disponível em: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000260889.page=116>. Acesso em 20 jun 2023.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25- 40, 1994.

VIDAL, M.C.; SALDANHA, R.; VERISSIMO, M.A.A. Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável. In: GINDRI, D. M.; MOREIRA, P. A. B., VERISSIMO, M. A. A. (org.). **Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável**. Florianópolis: CIDASC, 1 ed., p. 382-410, 2020.

WICKERT, A.D., et al. Open-source Arduino-compatible data loggers designed for field research. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2065, 2019.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WÓJCIK, M.; KALITA, M.; MAŁEK, W. Numerical analysis of phenotypic properties, genomic fingerprinting, and multilocus sequence analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Lembotropis nigricans* of the tribe Genisteeae. **Annals of Microbiology**, n. 69, p. 1123–1134, 2019.

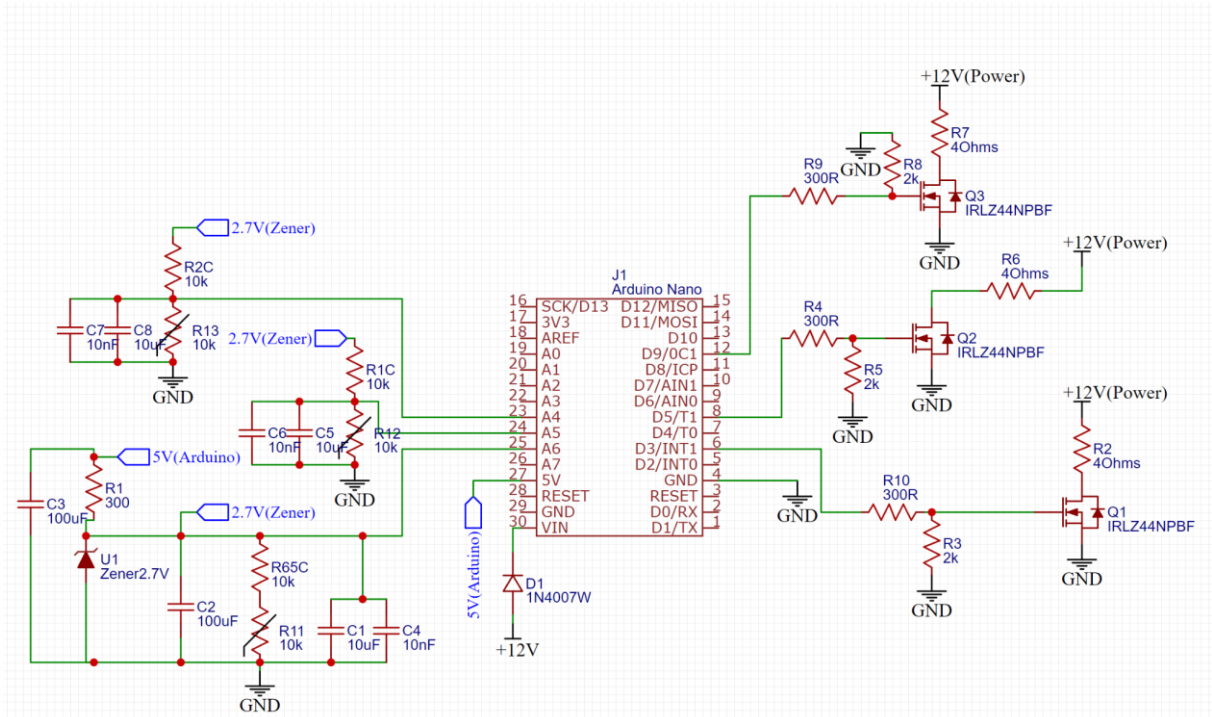
XIA, J.; ZHAO, Q.; GAO, B.; CHANG, A.; ZHANG, B.; MA, R. Preparation and electrical properties of  $Mn_{1.05-y}Co_{1.95-x-z-w}Ni_xMgyAlzFewO_4$  NTC ceramic derived from microemulsion method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 591, p. 207-212, 2014.

ZHU, H.; ZHANG, H.; XU, Y.; LAŠŠÁKOVÁ, S.; KORABEČNÁ, M.; NEUŽIL, P. PCR past, present and future. **BioTechniques**, v. 69, n.4, p. 317-325, 2020.

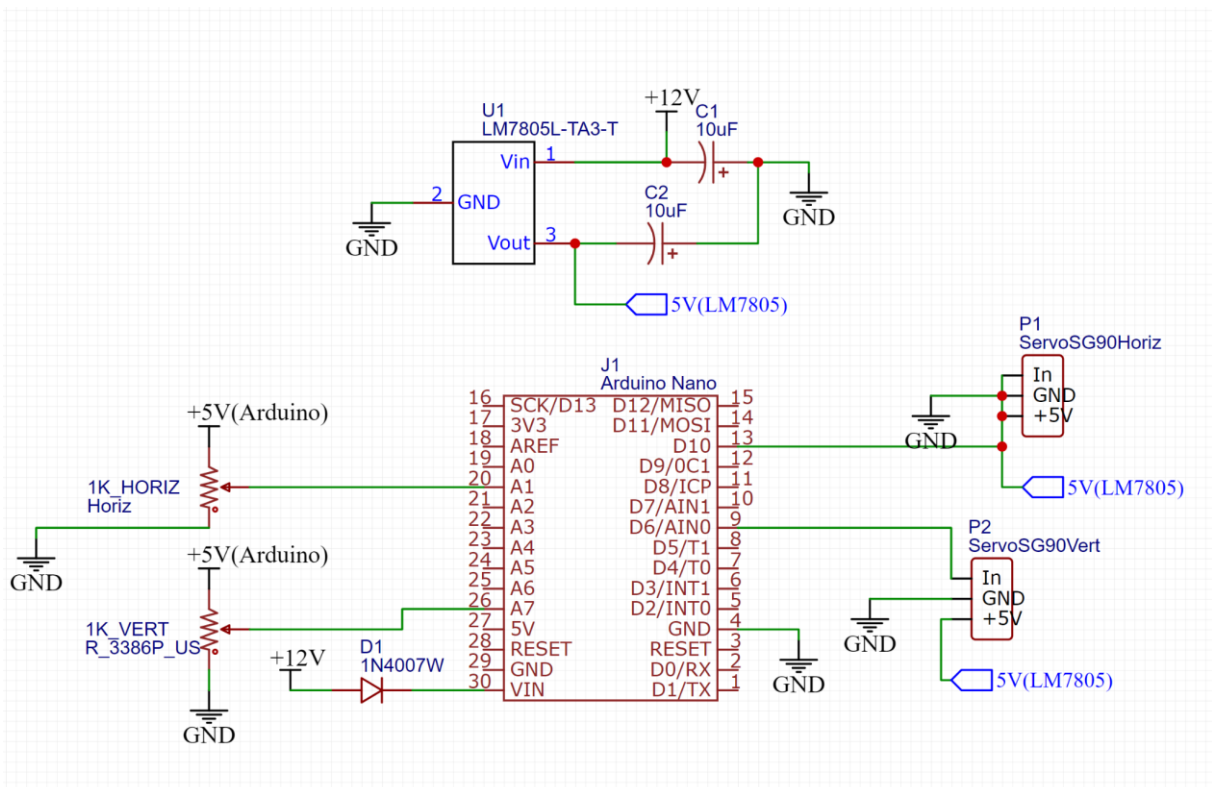
ZOU, Y. et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. **PLOS Biology**, v. 15, n. 11, 2017.

ZULUAGA, M.Y.A.; LIMA, K.M.M.; AZEREDO, L.S.G.; MARTINEZ, A.L.O. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of *Solanum*. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, 2020.

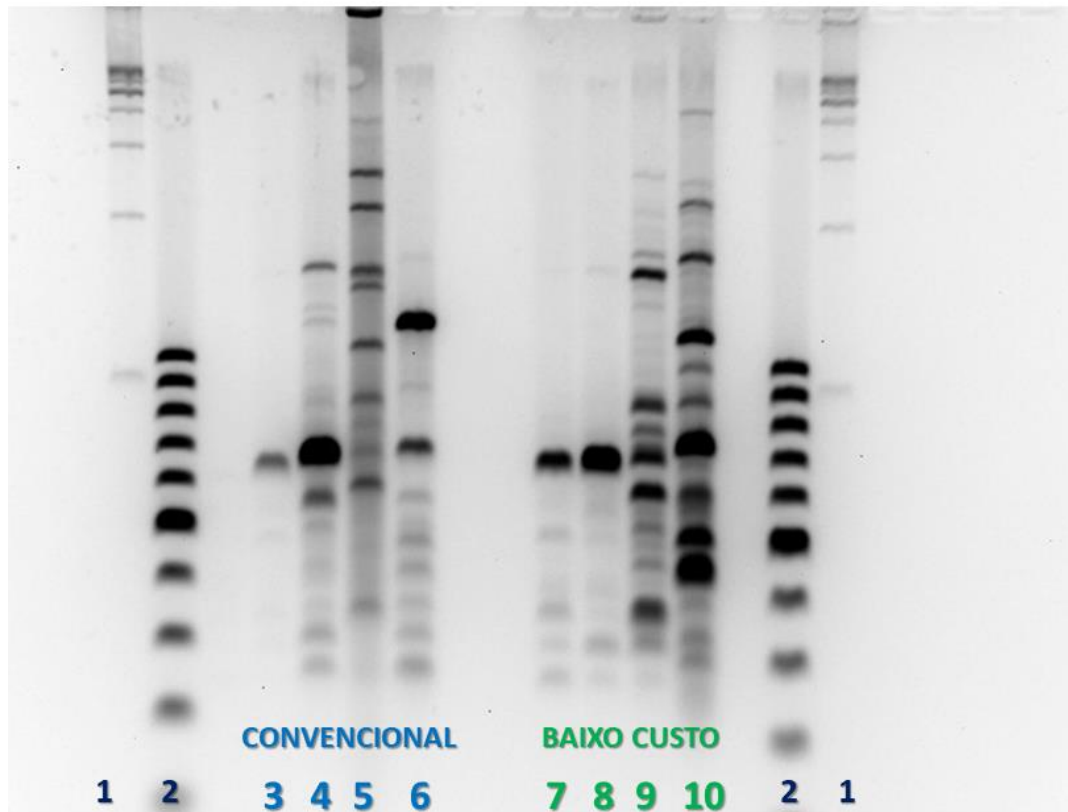
## ANEXOS



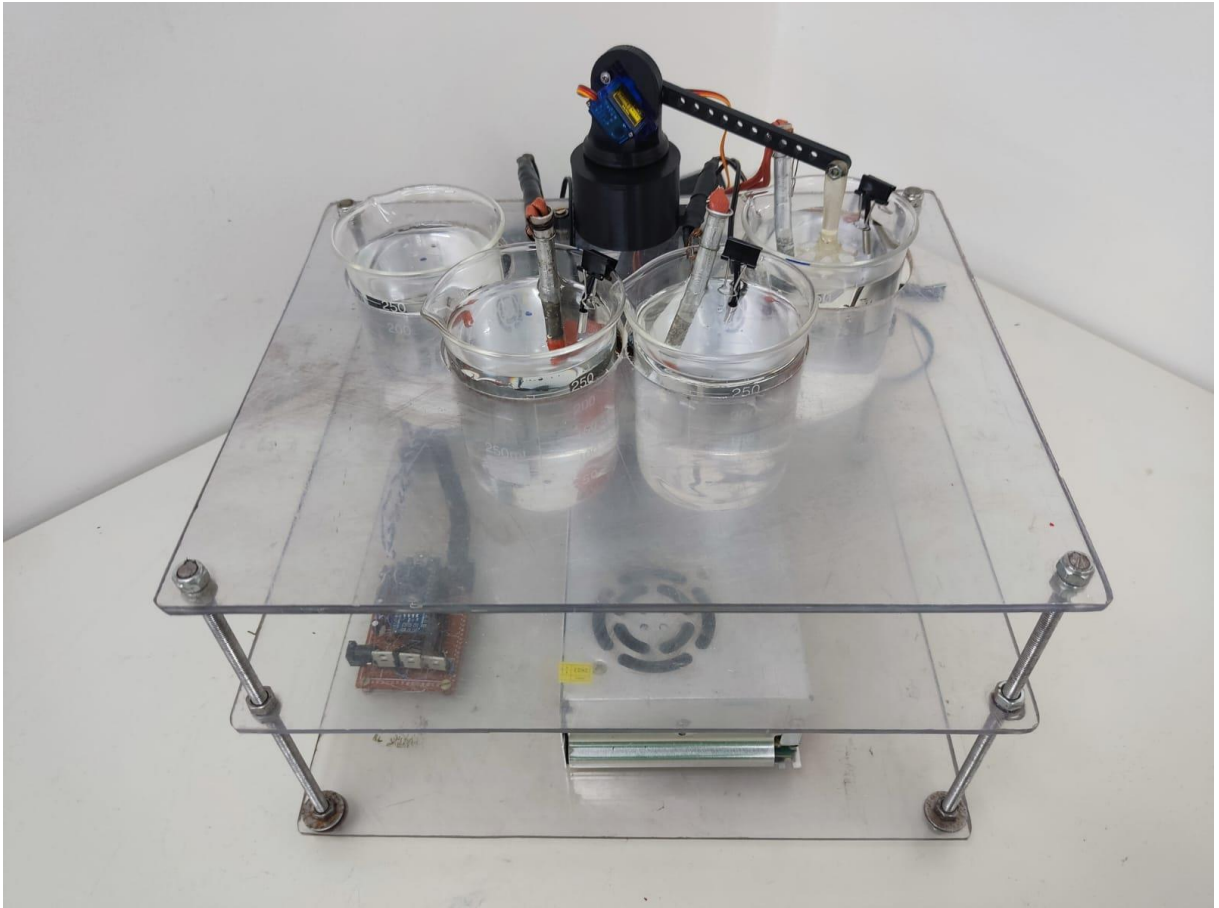
**Figura S1.** Esquema eletrônico do controlador do termociclador. Os três termistores usados para monitorar a temperatura estão indicados como R11, R12 e R13. Para o aquecimento dos recipientes com água são utilizados três resistências, uma para cada recipiente, indicadas como R2, R6 e R7. A corrente aplicada nessas resistências é mediada por mosfets (IRLZ44N) através de modulação de largura de pulso fornecida pelo Arduino pelas portas digitais (D3, D5 e D9). Esse esquema encontra-se publicamente disponível no repositório do GitHub desse projeto.



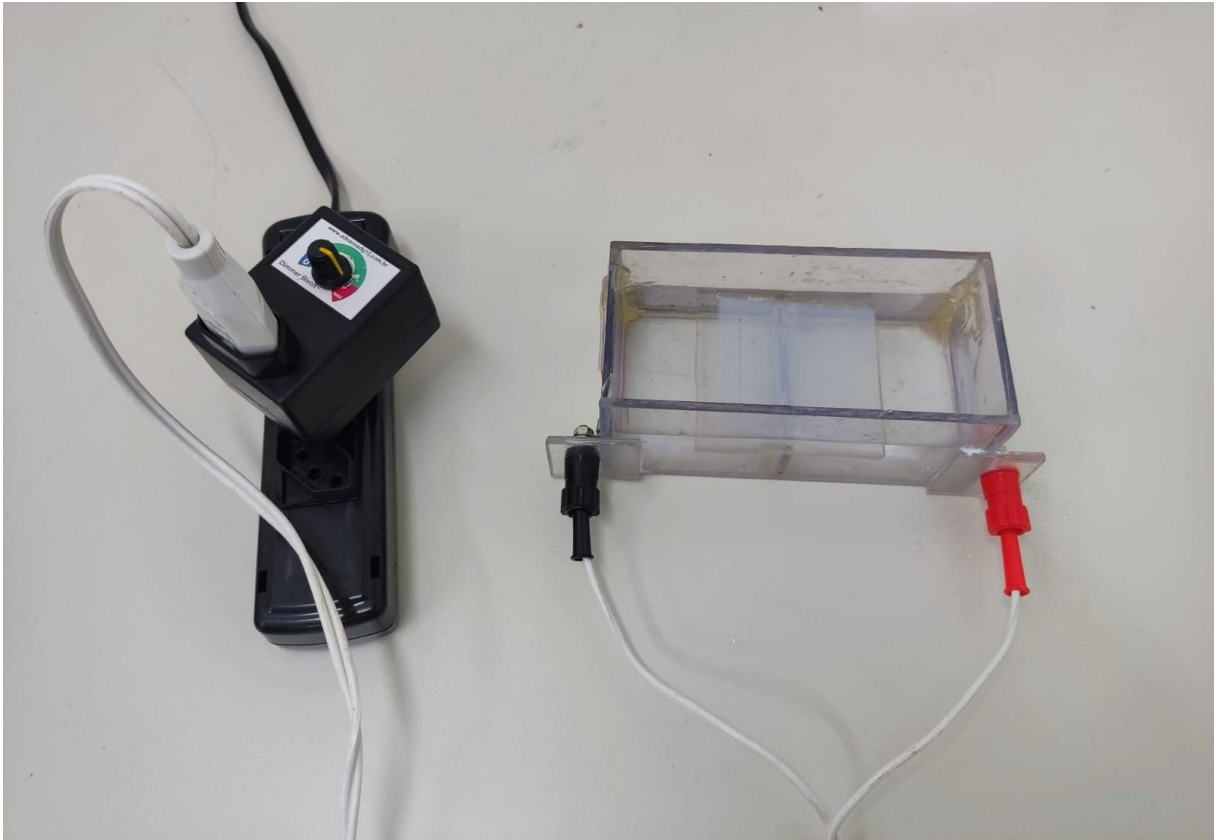
**Figura S2.** Esquema eletrônico do controlador do braço robótico composto por dois servomotores (ServoSG90Horiz e ServoSG90Vert) alimentados por um regulador de tensão (LM7085) e controlados por uma placa Arduino Nano. Dois potenciômetros (1K\_Horiz e 1K\_Vert) foram adicionados para facilitar o ajuste manual da posição do braço robótico. Esse esquema encontra-se publicamente disponível no repositório do GitHub desse projeto.



**Figura S3:** Perfil de bandas por eletroforese em gel de agarose das amostras de PCR do termociclador convencional e do de baixo custo entre diferentes gêneros. Os números 1 e 2 indicam os marcadores de 1kb e 100 bp, respectivamente. Os números de 3 a 6 e 7 a 10 são das estirpes: SEMIA 5019, SEMIA 587, UFLA 06-37, UFLA 3-321, respectivamente. Os números 3 e 7 indicam a degradação da estirpe SEMIA 5019 com os ciclos de congelamento e descongelamento, não tendo seus padrões de banda amplificados em ambos equipamentos.



**Figura S4:** Versão atual do termociclador desenvolvido neste trabalho.



**Figura S5:** Versão atual da cuba e fonte de eletroforese desenvolvida neste trabalho.