

RESSALVA

**Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo deste
documento será
disponibilizado somente a
partir de 15/02/2027.**



LILIAN DANIELLE DE MOURA TORQUATO

**Produção de hidrogênio verde (H₂V) e eletricidade em sistemas
fotobioeletroquímicos utilizando bactérias fotossintéticas extraídas de lodo de
tratamento de efluentes**

Relatório de Pós-doutorado (Edital
06/2024/PROPG-PROPe, PD-AF) realizado
na Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Fulho" (UNESP), Instituto de
Química.

Supervisora: Profa. Dra. Maria Valnice
Boldrin

PROGRAMA DE PÓS-DOCTORADO DA UNESP

Araraquara

2025



RESUMO

Durante bilhões de anos de evolução, a natureza encontrou diferentes maneiras de utilizar a luz solar como fonte de energia, por meio de fotossistemas complexos e sofisticados. A capacidade de realizar a transdução de energia luminosa, bem como a extraordinária diversidade metabólica das bactérias roxas fotoheterotróficas (*purple non-sulfur bacteria*, *PNSB*) abrem novos caminhos para produção de hidrogênio verde (H₂V) e eletricidade a partir da degradação da matéria orgânica presente em águas residuárias por meio de sistemas foto-bioeletroquímicos (*PBES*), criando perspectivas para atender simultaneamente à necessidade de tratamento de efluentes e a crescente demanda por energia limpa e sustentável. Projeções demonstram que o Brasil tem potencial para ser maior produtor de H₂V, por reunir condições ideais para produção em massa de fontes de energia fundamentais para impulsionar a transição para uma economia de baixo carbono. A inovação trazida pela presente proposta está na produção de H₂V e eletricidade por meio da integração entre o processo de digestão anaeróbia com *PBES*, explorando a atividade foto-bioeletrocatalítica das *PNSB*, que serão obtidas a partir de lodo de tratamento de efluentes. E no que compreende a temática da descarbonização do setor energético e da sustentabilidade, o projeto está embasado nos pilares i) da exploração e produção de energia limpa a partir de fontes renováveis e ii) do tratamento e transformação de resíduos e efluentes industriais potencialmente impactantes ao ambiente. Nesse sentido, espera-se que a presente pesquisa gere informações importantes que possam contribuir para a futura implementação de tecnologias de produção de H₂V autossustentadas por luz solar e biomassa, as quais, certamente, serão de suma importância para a economia de hidrogênio e para a descarbonização do setor energético mundial.

Palavras-chave: hidrogênio verde; bioeletricidade; sistemas foto-bioeletroquímicos; fotossíntese semi-artificial; eletrodos biohíbridos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Descarbonização do sistema energético e hidrogênio verde (H2V)

Nos últimos anos, a mudança de paradigma voltada à economia de hidrogênio trouxe consigo novas designações a fim de classificar as diferentes rotas de produção de H₂ existentes, como é o caso do hidrogênio verde (H2V), que pode, resumidamente, ser definido como o hidrogênio produzido a partir da eletrólise da água utilizando fontes de energia renováveis, ou seja, utilizando uma corrente elétrica que foi gerada sem emissões de gases com efeito de estufa, desde que a eletricidade utilizada para alimentar o processo seja inteiramente a partir de energias renováveis [1]. Desta forma, a produção de H2V deve ser realizada utilizando-se recursos renováveis como biomassa e água, juntamente com fontes de energia sustentáveis, como bioenergia, nuclear, geotérmica, eólica ou solar [2,3], por meio de tecnologias de processamento como eletrólise, decomposição termoquímica e métodos biológicos. Dentre estes métodos, a produção de H2V a partir de biomassa tem atraído muita atenção, uma vez que a biomassa é considerada uma fonte de energia neutra em carbono [4].

Um aspecto importante da produção de H2V é o fato de este combustível poder abastecer setores que são mais complexos de se eletrificar, como a indústria de processo intensivo e o transporte pesado, oferecendo uma alternativa de combustível limpo. Por fim, a cadeia produtiva do H2V se caracteriza por uma produção descentralizada, permitindo que as instalações sejam localizadas próximas às fontes de energia renovável e reduzindo as perdas de transmissão.

Projeções demonstram que, em razão de sua dimensão continental e particularidades regionais, o Brasil apresenta um enorme potencial para a produção de H2V, gerado a partir de fontes renováveis e com o aproveitamento de biomassa e a instalação de parques de energia eólica e solar, entre outras, além de baixos custos marginais e potencial de produção muito além do que o mercado interno pode absorver. O hidrogênio já é produzido, armazenado, transportado e utilizado em larga escala. São mais de 100 milhões de toneladas por ano, e o Brasil contribui com cerca de 1% disso atualmente. Em 2050, o mundo deverá produzir cerca de 540 milhões de toneladas de hidrogênio [5] e o Brasil terá grande participação para atender a essa demanda, com investimento direto de R\$ 600 bilhões nos próximos 25 anos e faturamento

anual de R\$ 150 bilhões até 2050, dos quais R\$ 100 bilhões virão de exportações. A economia brasileira de hidrogênio bem estabelecida deve se tornar uma realidade no médio prazo (entre 6 e 10 anos) [6].

1.2. Bioenergia a partir de resíduos

O modelo sustentável de produção de energia está voltado à produção de energia elétrica, combustíveis líquidos ou gasosos (biogás, bioH₂) [7] a partir de biomassas e fontes secundárias como os subprodutos de processos produtivos ou de beneficiamento, como é o caso dos resíduos gerados nas agroindústrias.

As culturas cítricas (laranjas, limões, etc) estão entre as mais abundantes do mundo e seu processamento visa, principalmente, à extração de suco. No entanto, a partir dessas frutas são obtidos diversos outros produtos com alto valor agregado, tanto para indústria química (flavonóides, óleos essenciais, limoneno e pectina) [8], quanto para a indústria de alimentos [9,10]. Durante todas as etapas de beneficiamento destas frutas, a quantidade de efluentes gerados é notável. E devido à sua elevada carga de matéria orgânica e nutrientes, estes podem causar vários impactos ambientais quando dispostos indevidamente, tais como: contaminação de recursos hídricos superficiais e subterrâneos (passível de eutrofização), proliferação de vetores de doenças e a emissão de gases de efeito estufa, durante a sua degradação no solo [11], por exemplo.

1.3. Fotossíntese e fotoquímica das bactérias roxas não sulfurosas (reduzir esse tópico)

A fotossíntese originou-se há aproximadamente 3,5 bilhões de anos, provavelmente a partir de uma bactéria gram-negativa roxa. O processo de fotoferrmentação é realizado por um grupo diverso de PNSB, tais como *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustres*, *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*, que são capazes de utilizar as regiões do infravermelho próximo (700–950 nm) e do visível (400–700 nm) do espectro solar para produzir H₂ anaerobicamente, a partir de uma gama de substratos orgânicos [2] como ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, álcoois, carboidratos e, até mesmo,

compostos aromáticos. Os processos voltados à produção dos chamados “*solar fuels*” possibilitam o melhor aproveitamento energético da energia solar, a partir de sua conversão em combustíveis com alta densidade de energia, os quais podem ser armazenados e transportados para fora dos centros produtores [5–7]. Dessa forma, a ampla utilização de um sistema energético baseado na produção de hidrogênio autossustentada por luz será crucial para a obtenção de sustentabilidade mundial [3].

1.4. Sistemas (foto)bioeletroquímicos aplicados à produção de eletricidade e H₂

Há mais de um século descobriu-se que as alterações químicas decorrentes de um processo fisiológico estão associadas a alteração elétricas e esta resposta elétrica, por sua vez, pode ser transferida extracelularmente por determinadas bactérias, enquanto degradam matéria orgânica [12]. Mais recentemente, no entanto, a conversão de energia química presente em um substrato em eletricidade, hidrogênio ou compostos químicos de alto valor agregado por um biocatalisador tornou-se uma possibilidade concreta através dos sistemas bioeletroquímicos (*Bio-Electrochemical Systems, BESs*) [13].

Uma *MFC* (*Microbial Fuel Cell*) é um dispositivo bioeletroquímico no qual se produz corrente elétrica a partir da oxidação de substratos orgânicos sob condições anaeróbias, sendo esta realizada por biofilmes de bactérias exoeletrogênicas imobilizadas no anodo, ou seja, bactérias eletroquimicamente ativas, capazes de transferir elétrons para fora da célula. Esses elétrons migram para o catodo por um circuito externo, produzindo eletricidade no processo, enquanto os prótons se movem em direção à câmara do catodo por meio de uma membrana semipermeável, reagindo com o oxigênio ali presente para produzir água. Nesse caso, os biofilmes bacterianos eletroativos desenvolvidos no anodo funcionam como unidade eletrocatalítica para geração de eletricidade [14,15].

Além de bioeletricidade, os elétrons gerados no bioanodo também podem ser usados para a síntese de vários compostos químicos, como o H₂, dependendo dos aceptores de elétrons presentes no catolito. Nesse caso, o dispositivo de bioeletrólise é chamado de *MEC* (*Microbial Electrolysis Cell*), no qual gera-se H₂ a

partir da oxidação biológica de resíduos orgânicos, sob tensão externa adicional, a fim de superar a barreira termodinâmica necessária à conversão de prótons em gás hidrogênio. Quando o reator é composto por dois compartimentos separados por uma membrana semipermeável [16], é possível a obtenção de H₂ puro [17], diferentemente dos reatores de digestão anaeróbia convencionais (*dark fermentation, DF*), cujo *headspace* é uma mistura de H₂ e CO₂.

Logo, a MEC é uma tecnologia de produção de H₂V muito atrativa visto que, em vez de eletrodos a base de metais nobres, emprega eletrodos construídos a partir bactérias eletroquimicamente ativas para converter matéria orgânica em H₂ e uma ampla gama de compostos químicos como metano, acetato, peróxido de hidrogênio, etanol, e ácido fórmico [17]. Alternativamente, a energia adicional necessária à bioeletro-hidrogênese em um dispositivo MEC pode ser fornecida por uma fonte de energia renovável, como a luz solar, que é uma abordagem bastante promissora, dentro do contexto de sustentabilidade.

A exploração da notável versatilidade metabólica das bactérias roxas *PNSB* é de grande interesse para a aplicação destes organismos em sistemas fotobioeletroquímicos (*Photo-bioelectrochemical systems, PBES*) [18]. Tais dispositivos biohíbridos (bióticos/abióticos), permitem a realização da chamada “fotossíntese semi-artificial”, abrindo portas para a possibilidade de controlar o processo fotossintético para a finalidade desejada. Assim, a luz solar é utilizada como força motriz para a produção de bioenergia (bioeletricidade e bio-hidrogênio/H₂V) e compostos químicos alvo, bem como para autossustentar a plataforma biossintética, a partir da oxidação da matéria orgânica, em condições anaeróbicas [19]. A utilização de bactérias fotossintéticas intactas, em vez de aparatos fotossintéticos isolados (enzimas), é uma estratégia inovadora e ainda pouco explorada na qual são dispensadas as etapas demoradas de isolamento e purificação, fornecendo aos biocatalisadores recursos de autorreplicação e reparo.

O desenvolvimento de plataformas biohíbridas eficientes, no entanto, requer a criação de uma interface eletroquímica coerente entre o organismo fotossintético e a superfície do eletrodo para coletar os elétrons fotoinduzidos produzidos, um processo conhecido como transferência de elétrons extracelular fotoinduzida (*photoinduced extracellular electron transfer, PEET*), uma vez que os sítios ativos

Essa co-supervisão foi realizada durante 3 meses, período em que o aluno estrangeiro desenvolveu suas atividades de intercâmbio no Instituto de Química de Araraquara, que ocorreu por meio do Acordo de Cooperação Internacional firmado entre a UNESP e a Universidade Italiana UNIBA, por meio do Projeto DESK: *Developing Shared Knowledge in Innovative Materials and Digital Transformation for Sustainable Economy and Green Transition* - Proposta TNE23-00022; Work Package 4: “Advanced Innovative Materials”.

6. DISCIPLINAS MINISTRADAS COM A RESPECTIVA CARGA HORÁRIA E/OU A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE EXTENSÃO.

A disciplina “*Sistemas (foto)bioeletroquímicos para a produção de energia renovável*”, vinculada a essa proposta, estava prevista para ser ministrada no segundo semestre de 2025, caso a bolsa fosse renovada.

7. COMENTÁRIOS DO SUPERVISOR

Este relatório evidencia a dedicação da bolsista durante a realização das atividades de pesquisa deste projeto, trabalhando com a integração e contribuição de diferentes áreas do conhecimento para o aproveitamento de diferentes resíduos (lodo, efluente industrial) com foco na produção de H₂, eletricidade e compostos químicos de alto valor agregado (1-butanol), colocando em prática o conceito de biorrefinaria. É importante destacar a elevada potência alcançada na foto microbial fuel cell concomitantemente à produção de hidrogênio verde, particularmente quando substratos residuais do processo fermentativo foram utilizados, durante longos períodos de operação, o que abre caminho para a aplicação efetiva de dispositivos fotobioeletroquímicos sustentáveis foto-alimentadas para a produção de energia limpa, concretizando-se, assim, os objetivos do projeto proposto.

Estas conquistas preencherão uma lacuna muito importante para viabilizar a aplicação prática de microrganismos fotossintéticos intactos em sistemas bioeletroquímicos para a produção de hidrogênio verde e, assim, abrirão portas

para futuras aplicações desses sistemas para a geração de energia limpa, concomitantemente à biorremediação de poluentes em ambientes aquáticos.

REFERÊNCIAS

- [1] A.M. Oliveira, R.R. Beswick, Y. Yan, A green hydrogen economy for a renewable energy society, *Current Opinion in Chemical Engineering* 33 (2021) 100701. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2021.100701>.
- [2] P.J. Megía, A.J. Vizcaíno, J.A. Calles, A. Carrero, Hydrogen Production Technologies: From Fossil Fuels toward Renewable Sources. A Mini Review, *Energy Fuels* 35 (2021) 16403–16415. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c02501>.
- [3] N. Sazali, Emerging technologies by hydrogen: A review, *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (2020) 18753–18771. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.05.021>.
- [4] D. Guban, I.K. Muritala, M. Roeb, C. Sattler, Assessment of sustainable high temperature hydrogen production technologies, *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (2020) 26156–26165. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.145>.
- [5] Agência senado, Brasil tem grande potencial de produção de hidrogênio verde, dizem especialistas, (2023). <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2023/05/17/brasil-tem-grande-potencial-de-producao-de-hidrogenio-verde-dizem-especialistas#:~:text=Em%20raz%C3%A3o%20de%20sua%20dimens%C3%A3o,e%C3%B3lica%20e%20solar%2C%20entre%20outras>.
- [6] C. Chantre, S. Andrade Eliziário, F. Pradelle, A.C. Católico, A.M. Branquinho Das Dores, E. Torres Serra, R. Campello Tucunduva, V. Botelho Pimenta Cantarino, S. Leal Braga, Hydrogen economy development in Brazil: An analysis of stakeholders' perception, *Sustainable Production and Consumption* 34 (2022) 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2022.08.028>.
- [7] H. Ruppert, M. Kappas, J. Ibendorf, Sustainable Bioenergy Production: an integrated perspective, in: H. Ruppert, M. Kappas, J. Ibendorf (Eds.), *Sustainable Bioenergy Production - An Integrated Approach*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2013: pp. 3–35. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6642-6_1.

- [8] M. Pourbafrani, G. Forgács, I. Sárvári, C. Niklasson, Bioresource Technology Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes, 101 (2010) 4246–4250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.077>.
- [9] V. Ferreira-Leitão, L.M.F. Gottschalk, M.A. Ferrara, A.L. Nepomuceno, H.B.C. Molinari, E.P.S. Bon, Biomass residues in Brazil: availability and potential uses, Waste and Biomass Valorization 1 (2010) 65–76. <https://doi.org/10.1007/s12649-010-9008-8>.
- [10] F.R. Marín, C. Soler-Rivas, O. Benavente-García, J. Castillo, J.A. Pérez-Alvarez, By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres, Food Chemistry 100 (2007) 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.040>.
- [11] C.A. Christofolletti, J.P. Escher, J.E. Correia, J. Fernanda, U. Marinho, C.S. Fontanetti, Sugarcane vinasse: environmental implications of its use, Waste Management 33 (2013) 2752–2761.
- [12] M.C. Potter, Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds, Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character 84 (1911) 260–276.
- [13] D. Pant, A. Singh, G. Van Bogaert, Y. Alvarez, L. Diels, K. Vanbroekhoven, An introduction to the life cycle assessment (LCA) of bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy and product generation: Relevance and key aspects, 15 (2011) 1305–1313. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.10.005>.
- [14] Z.M.A. Bundhoo, Coupling dark fermentation with biochemical or bioelectrochemical systems for enhanced bio-energy production: a review, International Journal of Hydrogen Energy 42 (2017) 26667–26686. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.09.050>.
- [15] C. Santoro, C. Arbizzani, B. Erable, I. Ieropoulos, Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review, Journal of Power Sources 235 (2017) 225–244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>.
- [16] B.E. Logan, J.M. Regan, Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells, Trends in Microbiology 14 (2006) 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.10.003>.
- [17] A. Kadier, M.S. Kalil, P. Abdeslahian, K. Chandrasekhar, A. Mohamed, N.F. Azman, W. Logroño, Y. Simayi, A.A. Hamid, Recent advances and emerging challenges in microbial electrolysis cells (MECs) for microbial production of hydrogen and value-added

- chemicals, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 61 (2016) 501–525. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.017>.
- [18] L.D. de M. Torquato, M. Grattieri, Photobioelectrochemistry of intact photosynthetic bacteria: Advances and future outlook, *Current Opinion in Electrochemistry* 34 (2022) 101018. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2022.101018>.
- [19] N. Kornienko, J.Z. Zhang, K.K. Sakimoto, P. Yang, E. Reisner, Interfacing nature's catalytic machinery with synthetic materials for semi-artificial photosynthesis, *Nature Nanotechnology* 13 (2018) 890–899. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0251-7>.
- [20] G. Buscemi, D. Vona, P. Stufano, R. Labarile, P. Cosma, A. Agostiano, M. Trotta, G.M. Farinola, M. Grattieri, Bio-Inspired Redox-Adhesive Polydopamine Matrix for Intact Bacteria Biohybrid Photoanodes, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 14 (2022) 26631–26641. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c02410>.
- [21] L.D. de Moura Torquato, R.M. Matteucci, P. Stufano, D. Vona, G.M. Farinola, M. Trotta, M.V. Boldrin Zanoni, M. Grattieri, Photobioelectrocatalysis of Intact Photosynthetic Bacteria Exposed to Dinitrophenol, *ChemElectroChem* 10 (2023) e202300013. <https://doi.org/10.1002/celc.202300013>.
- [22] M. Grattieri, Z. Rhodes, D.P. Hickey, K. Beaver, S.D. Minter, Understanding biophotocurrent generation in photosynthetic purple bacteria, *ACS Catal.* 9 (2019) 867–873. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b04464>.
- [23] C.Z. Lazaro, D.V. Vich, J.S. Hirasawa, M.B.A. Varesche, Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium, *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (2012) 11691–11700. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.088>.
- [24] Rodrigues, Caroline V., Codigestão anaeróbia do glicerol bruto em resíduos orgânicos agroindustriais visando à geração de biogás, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2021.
- [25] N.M.C. Saady, Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge, *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (2013) 13172–13191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.
- [26] L.D.M. Torquato, R. Pachiega, M.S. Crespi, M.G. Nespeca, J.E. de Oliveira, S.I. Maintinguer, Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge, *Waste Management* 59 (2017) 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.047>.

- [27] E.M. Green, Fermentative production of butanol—the industrial perspective, *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2011) 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.004>.
- [28] V. Singh, H. Singh, D. Das, Optimization of the medium composition for the improvement of hydrogen and butanol production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923, *International Journal of Hydrogen Energy* 44 (2019) 26905–26919. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.125>.
- [29] T. Tang, Y. Chen, M. Liu, Y. Du, Y. Tan, Effect of pH on the performance of hydrogen production by dark fermentation coupled denitrification, *Environmental Research* 208 (2022) 112663. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112663>.
- [30] K. Beaver, E.M. Gaffney, S.D. Minter, Understanding metabolic bioelectrocatalysis of the purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* through substrate modulation, *Electrochimica Acta* 416 (2022) 140291. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140291>.
- [31] V.J. Watson, B.E. Logan, Analysis of polarization methods for elimination of power overshoot in microbial fuel cells, *Electrochemistry Communications* 13 (2011) 54–56. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.11.011>.
- [32] X. Hu, T. Ritz, A. Damjanović, F. Autenrieth, K. Schulten, Photosynthetic apparatus of purple bacteria, *Quarterly Reviews of Biophysics* 35 (2002) 1–62. <https://doi.org/10.1017/S0033583501003754>.
- [33] J. Fradinho, L.D. Allegue, M. Ventura, J.A. Melero, M.A.M. Reis, D. Puyol, Up-scale challenges on biopolymer production from waste streams by Purple Phototrophic Bacteria mixed cultures: A critical review, *Bioresource Technology* 327 (2021) 124820. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124820>.
- [34] A. Alsiyabi, C.M. Immethun, R. Saha, Modeling the Interplay between Photosynthesis, CO₂ Fixation, and the Quinone Pool in a Purple Non-Sulfur Bacterium, *Sci Rep* 9 (2019) 12638. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49079-z>.
- [35] A. Bharti, R. Natarajan, Chapter 7 - Proton exchange membrane testing and diagnostics, in: G. Kaur (Ed.), *PEM Fuel Cells*, Elsevier, 2022: pp. 137–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823708-3.00007-9>.
- [36] M. Li, P. Ning, Y. Sun, J. Luo, J. Yang, Characteristics and Application of *Rhodospseudomonas palustris* as a Microbial Cell Factory, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.897003>.