

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

GUILHERME DE OLIVEIRA MENDES OHIRA

**Desenvolvimento de ferramentas e algoritmos em *Computational Strain
Optimization Models***

São Paulo

2023

GUILHERME DE OLIVEIRA MENDES OHIRA

Desenvolvimento de ferramentas e algoritmos em *Computational Strain Optimization Models*

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo programa de pós-graduação em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Galo Antonio Carrillo Le Roux

SÃO PAULO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 08 de novembro de 2023

Assinatura do autor: Guilherme de Oliveira H. Ohira

Assinatura do orientador: [Assinatura]

Catlogação-na-publicação

Ohira, Guilherme

Desenvolvimento de ferramentas e algoritmos em Computational Strain Optimization Models / G. Ohira -- versão corr. -- São Paulo, 2023.
203 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.BIOLOGIA SINTÉTICA 2.PROGRAMAÇÃO MISTA 3.PROGRAMAÇÃO LINEAR 4.COMPLEMENTARIDADE I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

OHIRA, G. O. M. **Desenvolvimento de ferramentas e algoritmos em *Computational Strain Optimization Models***. 2023. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Aprovado em: 10/10/2023

Presidente da banca

Prof. Dr. Galo Antonio Carrillo Le Roux

Instituição: EP – USP

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Galo Antonio Carrillo Le Roux

Instituição: EP – USP

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr.: Bruno Faccini Santoro

Instituição: Externo

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr.: Rafael David de Oliveira

Instituição: NTNU – Externo

Julgamento: APROVADO

AGRADECIMENTOS

Quanto ao círculo social: agradeço à minha mãe pelo apoio ao longo da minha jornada no mestrado. Agradeço ainda a minha namorada, Fabiane Cristina Columna, pelo companheirismo e apoio emocional. Por fim, agradeço aos meus amigos e ao meu irmão, Rafael Castelan Castellão Laruccia, que mesmo sem entender nada, ouviram às minhas explicações.

Quanto ao círculo acadêmico: agradeço ao Prof. Dr. Galo Antonio Carrillo Le Roux, meu orientador, que me agraciou com a oportunidade de estudar um tema desejado. Graças a ele foi possível unir, nas proporções desejadas, a matemática e a biotecnologia. Agradeço ainda ao Willians de Oliveira Santos, que contribuiu com compartilhamento de conhecimento de diversas ferramentas de visualização. Por fim, agradeço a todos os professores e alunos que corroboraram na minha formação para que, um dia, eu defendesse essa dissertação.

Não menos importante, agradeço à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Quanto ao fomento: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo 88887.646953/2021-00.

“The only way to get rid of temptation is to yield to it.”

(WILDE, 2003).

RESUMO

OHIRA, G. O. M. **Desenvolvimento de ferramentas e algoritmos em *Computational Strain Optimization Models***. 2023. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Deleções de genes podem ser usadas como uma ferramenta para melhoramento de performance de microrganismos no contexto industrial. Apesar do estado-da-arte em biologia molecular possuir diversas técnicas para realizar as deleções, existem poucas estratégias para escolher os alvos. É possível abordar esse problema por técnicas de fluxômica e modelos baseados em restrições (CBM). A fim de assegurar que o objetivo biológico seja respeitado (maximização da biomassa), enquanto se melhora a performance do bioprocesso, é possível formular um problema de dois níveis (BLPP). Esse modelo simula o melhor cenário possível, para uma dada função objetivo industrial, enquanto sugere deleções. O primeiro algoritmo a realizar tal estratégia foi chamado de OptKnock (2003). Uma forma de lidar com o BLPP é reforçando as condições de otimalidade (Condições KKT) do problema interno, transformando o mesmo em um problema com restrições complementares (MPCC). Os autores do OptKnock sugerem aplicar a teoria da dualidade para evitar a não linearidade da complementariedade. Embora tenha sido realizado, nenhuma descrição matemática foi proposta para verificar se o ótimo obtido pelo MPCC é o mesmo obtido pelo BLPP. Na presente dissertação procurou-se verificar: (i) se as Condições KKT são respeitadas no problema interno. (ii) Se a região viável do MPCC e do BLPP são as mesmas para as variáveis primais. (iii) Se a Condição de Slater é verificada. Para tal, deduções e experimentos *in silico* foram sugeridos. Resultados mostram que as Condições KKT são respeitadas no problema interno. Muito embora, a unicidade das variáveis duais, quando usadas também como variáveis de otimização, possa remodelar os limites viáveis das variáveis primais. Dessa forma, o resultado do MPCC pode não ser o mesmo do BLPP inicialmente sugerido.

Palavras-chave: BIOLOGIA SINTÉTICA, PROGRAMAÇÃO MISTA, PROGRAMAÇÃO LINEAR, COMPLEMENTARIEDADE.

ABSTRACT

OHIRA, G. O. M. **Development of tools and algorithms in *Computational Strain Optimization Models***. 2023. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Gene knockouts can be used as a tool in order to enhance microorganism performance of a bioprocess. Molecular biology owns several state-of-the-art techniques to do so, but there is a lack of strategies in which targets knockouts it should be performed. It is possible to approach that problem by Fluxomic techniques and Constraint-Based Models (CBM). To hold the biological objective, while trying to enhance bioprocess performance, it is possible to formulate a Bilevel Programming Problem (BLPP). This model can simulate the best possible scenario for a given industrial objective function by suggesting knockouts. The first suggested algorithm, regarding above-mentioned strategy, is called OptKnock (2003). It approaches the BLPP by enforcing optimality conditions (KKT Conditions), which translates the problem to a Mathematical Problem with Complementarity Constraints (MPCC). OptKnock's authors suggested to apply dual theory to circumvent complementary and keep linearity. However, the mathematical description never elucidated if the optimal achieved by the MPCC is in fact the same of the original BLPP. In the present dissertation the following aspects were: (i) Optimality (KKT Conditions) of inner level problem. (ii) Primal Feasibility of both BLPP and MPCC. (iii) Slater Condition in of inner level. To do so, algebraic deductions and *in silico* experiments were suggested. Results showed that KKT Conditions hold in inner level. However, it was shown that a lack of unicity in dual variables, when used as optimization variables simultaneously, can reshape primal variables feasible bounds. Consequently, a MPCC of a BLPP can show different optimal results.

Keywords: SYNTHETIC BIOLOGY, MIXED PROGRAMMING, LINEAR PROGRAMMING, COMPLEMENTARITY.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica de um FVA	30
Figura 2 – Exemplo gráfico acerca das restrições de desigualdade	37
Figura 3 - Comparação do <i>OptKnock</i> e <i>RobustKnock</i>	63
Figura 4 - Rede metabólica do Caso I	78
Figura 5 – Gráfico Caso I para maximização de dióxido de carbono	102
Figura 6 – Gráfico Caso I para a maximização de etanol.....	107
Figura 7 – Solução alternativa para a maximização de succinato	148
Figura 8 - Comparação de da predição dos fluxos internos em nível de reação e proteínas ..	193
Figura 9 – Exemplificação da estratégia proposta.....	195
Figura 10 - Ilustração do algoritmo AERITH	202

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos CSOM-MP-K	55
Tabela 2 – Resultados Caso I para maximização de dióxido de carbono	103
Tabela 3 – Resultados Caso I para a maximização de etanol	107
Tabela 4 – Resultados: ReacKnock	113
Tabela 5 – Resultados: ARK.....	122
Tabela 6 – ARK: PPA.3 primeiro filtro	126
Tabela 7 - ARK: PPA.3 segundo filtro.....	126
Tabela 8 – ARK: PPA.4 CPD	128
Tabela 9 – Resultados: ARK-Q	133
Tabela 10 – ARK-Q: PPA.3 segundo filtro.....	137
Tabela 11 – Tempo Real necessário para todos os PPAs	140
Tabela 12 – Lista de Arquivos Suplementares.....	180
Tabela 13 – Nomes especiais das equações	181

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

API	<i>Application Programming Interface</i>
ARK	<i>Augmented ReacKnock</i>
ARK-Q	<i>Augmented ReacKnock Quadratic</i>
AS	Conjunto de soluções alternativo ótimo (<i>Alternative Set</i>)
BLPP	Problema de programaco matemática de dois níveis (<i>Bilevel Programming Problem</i>)
BST	Busca em árvore binária (<i>Binary Search Tree</i>)
CPD	Condição de Pertinência Dual
CQ	Qualificação de restrição (<i>Constraint Qualification</i>)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CS	Restrições complementares (<i>Complementarity Constraints</i>)
CSOM	<i>Computational Strain Optimization Model</i>
CSOM-MP-K	<i>CSOM-Mathematical Programming-Knockouts</i>
DF	Viabilidade dual (<i>Dual Feasibility</i>)
DW	Massa seca (<i>Dry Weight</i>)
FBA	<i>Flux Balance Analysis</i>
FBA ^{Strain}	<i>Flux Balance Analysis da Strain</i>
FBA ^{WT}	<i>Flux Balance Analysis da cepa WT</i>
FS	<i>Feasible Solutions</i>
FVA	<i>Flux Variability Analysis</i>
FVA ^{Strain} _{free}	Maximização da função objetivo industrial da Strain, sem restrições

FVA_{free}^{WT}	Maximização da função objetivo industrial da cepa WT, sem restrições
FVA_{sub}^{Strain}	Maximização da função objetivo industrial da Strain sujeito ao FBA^{Strain}
FVA_{sub}^{WT}	Maximização da função objetivo industrial da cepa WT sujeito ao FBA^{WT}
GDBB	<i>Genetic Design through Branch and Bound</i>
GEM	<i>Genomic Scale Metabolic Model</i>
GPR	Gene-Proteína-Reação (<i>Gene-Protein-Reaction</i>)
GPRA	Associação de gene-proteína-gene (<i>Gene-Protein-Reaction Association</i>)
KKT	Karush-Kuhn-Tucker
LICQ	<i>Linear Independence Constraint Qualification</i>
LP	Programação linear (<i>Linear Programming</i>)
LTM	<i>Logic Transformation Model</i>
MFCQ	Mangasarian-Fromovitz <i>Constraint Qualification</i>
MOMA	<i>Minimization of Metabolic Adjustment</i>
MPCC	<i>Mathematical Programs with Complementarity Constraints</i>
MRS	<i>Metabolic-Regulatory Steady state</i>
PF	Viabilidade primal (<i>Primal Feasibility</i>)
pFBA	<i>Parsimonious Flux Balance Analysis</i>
PPA	Algoritmos de pós processamento (<i>Post-Processing Algorithms</i>)
QP	Programação Quadrática (<i>Quadratic Programming</i>)
rFBA	<i>Regulatory Flux Balance Analysis</i>
ROOM	<i>Regulatory On/Off Minimization</i>
SBML	<i>Systems Biology Markup Language</i>

SR-FBA	<i>Steady-state Regulatory Flux Balance Analysis</i>
--------	--

VT	Tipo de violação
----	------------------

WT	<i>Wild Type</i>
----	------------------

LISTA DE SÍMBOLOS

Biologia de Sistemas

n	Número de reações <ul style="list-style-type: none">▪ $n \in \mathbb{R}^1$
m	Número de metabólitos <ul style="list-style-type: none">▪ $m \in \mathbb{R}^1$
I	Conjunto de índices <ul style="list-style-type: none">▪ $I = \{i \in \mathbb{N} 1 \leq i \leq n\}$
i_{bio}	Índice referente à biomassa <ul style="list-style-type: none">▪ $i_{bio} \in I$
α	Percentual da velocidade de formação de biomassa teórica
S	Matriz estequiométrica <ul style="list-style-type: none">▪ $S \in \mathbb{R}^{n \times m}$
v	Vetor dos fluxos metabólicos <ul style="list-style-type: none">▪ $v \in \mathbb{R}^n$▪ $[v_i] = mmol/(gWD \cdot h)$▪ $[v_{i_{bio}}] = h^{-1}$
v_{bio}	Velocidade específica de formação de biomassa <ul style="list-style-type: none">▪ $v_{bio} \in \mathbb{R}^1$▪ $[v_{bio}] = h^{-1}$
v_{ind}	Fluxo da função objetivo industrial <ul style="list-style-type: none">▪ $v_{ind} \in \mathbb{R}^1$▪ $[v_{ind}] = mmol/(gWD \cdot h)$
v^{wt}	Vetor dos fluxos da cepa <i>wild type</i> <ul style="list-style-type: none">▪ $v^{wt} \in \mathbb{R}^n$▪ $[v_i^{wt}] = mmol/(gWD \cdot h)$
LB	Vetor dos limites inferiores <ul style="list-style-type: none">▪ $LB \in \mathbb{R}^n$▪ $[LB_i] = mmol/(gWD \cdot h)$▪ $[LB_{i_{bio}}] = h^{-1}$

<i>UB</i>	Vetor dos limites superiores <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\mathbf{UB} \in \mathbb{R}^n$ ▪ $[UB_i] = \text{mmol}/(\text{gWD} \cdot \text{h})$ ▪ $[UB_{i_{bio}}] = \text{h}^{-1}$
<i>c</i>	Vetor de otimização <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\mathbf{c} \in \mathbb{R}^n$
<i>FS</i>	Conjunto de soluções viáveis <ul style="list-style-type: none"> ▪ $FS = \{\mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{0}, \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}\}$
<i>λ</i>	Vetor dos multiplicadores de Lagrange <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^m$
<i>μ</i>	Vetor dos multiplicadores de Kuhn-Tucker <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\boldsymbol{\mu} \in \mathbb{R}^{2n}$ ▪ $\boldsymbol{\mu}_1$ sempre está associada à <i>LB</i> (ou equivalente do limite inferior). ▪ $\boldsymbol{\mu}_2$ sempre está associada à <i>UB</i> (ou equivalente do limite superior).
<i>diag</i>	Função diagonal <ul style="list-style-type: none"> ▪ $diag: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^{n \times n}$
<i>q</i>	Condição de Pertinência dual <ul style="list-style-type: none"> ▪ $q \in \mathbb{R}^1$
<i>k</i>	Parâmetro arbitrário da função objetivo dual <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\mathbf{k} \in \mathbb{R}^n$

Problema *P*

<i>J</i>	Conjunto de índices das restrições de desigualdade <ul style="list-style-type: none"> ▪ $J = \{j \in \mathbb{N} 1 \leq j \leq j_{end}\}$
<i>J_{off}</i>	Subconjunto de índices das restrições de desigualdade – restrições inativas <ul style="list-style-type: none"> ▪ $J_{off} = \{j g_j < 0\}$
<i>J_{on}</i>	Subconjunto de índices das restrições de desigualdade – restrições ativas <ul style="list-style-type: none"> ▪ $J_{on} = \{j g_j = 0\}$
<i>K</i>	Conjunto de índices das restrições de igualdade <ul style="list-style-type: none"> ▪ $K = \{k \in \mathbb{N} 1 \leq k \leq k_{end}\}$
<i>f(x)</i>	Função objetivo <ul style="list-style-type: none"> ▪ $f: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$

$\theta(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu})$	Função objetivo (dual) <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\theta(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}) = \min_{\boldsymbol{x}} \{f(\boldsymbol{x}) + \mathbf{h}(\boldsymbol{x})^t \boldsymbol{\lambda} + \mathbf{g}(\boldsymbol{x})^t \boldsymbol{\mu}; \boldsymbol{x} \in X\}$
$\mathbf{h}(\boldsymbol{x})$	Vetor das restrições de igualdade <ul style="list-style-type: none"> ▪ $h_k: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$
$\mathbf{g}(\boldsymbol{x})$	Vetor das restrições de desigualdade <ul style="list-style-type: none"> ▪ $g_j: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$
$\boldsymbol{\lambda}$	Vetor dos multiplicadores de Lagrange <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^{k_{end}}$
$\boldsymbol{\mu}$	Vetor dos multiplicadores de Kuhn-Tucker <ul style="list-style-type: none"> ▪ $\boldsymbol{\mu} \in \mathbb{R}^{j_{end}}$
X	Conjunto de soluções viáveis <ul style="list-style-type: none"> ▪ $X = \{\boldsymbol{x} \in \mathbb{R}^l \mathbf{h}(\boldsymbol{x}) = \mathbf{0}, \mathbf{g}(\boldsymbol{x}) \leq \mathbf{0}\}$
W	Conjunto de soluções viáveis (dual) <ul style="list-style-type: none"> ▪ $W = \{\boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^m, \boldsymbol{\mu} \in \mathbb{R}^n \mathbf{c} - \mathbf{S}^t \boldsymbol{\lambda} + \boldsymbol{\mu} = \mathbf{0}; \boldsymbol{\mu} \geq \mathbf{0}\}$
AS_{Primal}	Conjunto de soluções ótimas alternativo <ul style="list-style-type: none"> ▪ $AS_{Primal} = \{\boldsymbol{x} \in X \nabla f(\bar{\boldsymbol{x}})^t (\boldsymbol{x} - \bar{\boldsymbol{x}}) = 0, \nabla f(\bar{\boldsymbol{x}}) = \nabla f(\boldsymbol{x})\}$
AS_{Dual}	Conjunto de soluções ótimas alternativo (dual) <ul style="list-style-type: none"> ▪ $AS_{Dual} = \left\{ \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu} \in W \mid \nabla \theta(\bar{\boldsymbol{\lambda}}, \bar{\boldsymbol{\mu}})^t \left(\begin{bmatrix} \boldsymbol{\lambda} \\ \boldsymbol{\mu} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \bar{\boldsymbol{\lambda}} \\ \bar{\boldsymbol{\mu}} \end{bmatrix} \right) = 0, \nabla \theta(\bar{\boldsymbol{\lambda}}, \bar{\boldsymbol{\mu}}) = \nabla \theta(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}) \right\}$
δ	Escalar numericamente pequeno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1.1 <i>Objetivos principais</i>	23
2.1.2 <i>Objetivos secundários</i>	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1.1 <i>Fluxômica</i>	25
3.1.1.1 Análise de Balanço de Fluxo (FBA).....	27
3.1.1.2 Análise de Variabilidade de Fluxo (FVA).....	29
3.1.1.3 MOMA.....	31
3.1.2 <i>Modelos metabólicos</i>	33
3.1.3 <i>Programação matemática</i>	33
3.1.3.1 Programação linear	34
3.1.3.2 Condições gerais de otimalidade.....	35
3.1.3.3 Qualificação de restrições	38
3.1.3.3.1 Condição de Slater (Slater CQ)	38
3.1.3.3.2 <i>Linear Independence Constraint Qualification</i> (LICQ).....	39
3.1.3.3.3 Mangasarian-Fromovitz CQ (MFCQ).....	40
3.1.3.4 Unicidade	40
3.1.3.5 Simplex	41
3.1.3.5.1 Problemas de performance.....	42
3.1.3.6 Dualidade lagrangeana	43
3.1.3.6.1 Dualidade forte e fraca.....	44
3.1.3.6.2 Dualidade lagrangeana em LP	45
3.1.3.7 MPCC.....	46
3.1.3.7.1 Caso especial: LP	49
3.1.3.8 Bilinearidades em programação inteira mista	51
3.1.4 <i>Algoritmos CSOM</i>	51
3.1.5 <i>Algoritmos CSOM-MP-K</i>	54
3.1.5.1 OptKnock (BURGARD <i>et al.</i> , 2003).....	56
3.1.5.1.1 OptKnock Reformulado (CHOWDHURY <i>et al.</i> , 2015).....	60
3.1.5.2 RobustKnock (TEPPER e SHLOMI, 2010)	61
3.1.5.3 ReactKnock (XU <i>et al.</i> , 2013).....	64
3.1.5.4 Conclusões preliminares.....	66
3.1.6 <i>Pós-processamento de CSOM</i>	67
3.1.6.1 Ajuste biológico	68
3.1.6.2 Métricas arbitrárias	69

3.1.6.3 Considerações parciais	70
4 METODOLOGIA	72
4.1.1 Especificações técnicas.....	73
4.1.1.1 Tipos de métodos usados	73
4.1.2 GEM	74
4.1.3 Meio de cultura	75
4.1.4 Pré-processamento	76
4.1.5 Processamento.....	77
4.1.5.1 Caso I	77
4.1.5.2 Caso II	79
4.1.5.2.1 Parâmetros do <i>solver</i>	80
4.1.5.2.2 Definição de caso sequencial e simultâneo.....	82
4.1.5.2.3 ReactKnock	84
4.1.5.2.4 ARK (Augmented ReactKnock).....	87
4.1.5.2.5 ARK-Q (Augmented ReactKnock Quadratic)	90
4.1.6 Pós-processamento	92
4.1.6.1 Caso I	92
4.1.6.2 Caso II	92
4.1.6.2.1 Tabela resumo	94
4.1.6.2.2 PPA.1: Violação da definição de CS - I	95
4.1.6.2.3 PPA.2: Violação da definição de CS - II	95
4.1.6.2.4 PPA.3: FVA	96
4.1.6.2.5 PPA.4: Pertinência das variáveis duais em AS dual do caso sequencial.....	97
4.1.6.2.6 PPA.5: Violação de Slater CQ.....	99
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1.1 Caso I.....	101
5.1.1.1 Contextualização com viés biológico	101
5.1.1.2 Resultado: Maximização de dióxido de carbono	102
5.1.1.3 Resultado: Maximização de etanol	106
5.1.1.4 Conclusões: Caso I	111
5.1.2 Caso II.....	111
5.1.2.1 Resultados: ReactKnock.....	112
5.1.2.1.1 Processamento: ReactKnock.....	112
5.1.2.1.2 Pós-Processamento: ReactKnock.....	117
5.1.2.1.3 Treonina	120
5.1.2.2 Resultados: ARK.....	121
5.1.2.2.1 Processamento: ARK	121
5.1.2.2.2 Pós-Processamento: ARK	125
5.1.2.2.3 Treonina	130
5.1.2.3 Resultados: ARK-Q.....	132

5.1.2.3.1 Processamento: ARK-Q	132
5.1.2.3.2 Pós-Processamento: ARK-Q.....	136
5.1.2.3.3 Treonina	139
5.1.2.4 Comparações.....	139
5.1.2.4.1 Tempo	139
5.1.2.4.2 Perda de significado matemático	141
5.1.2.4.3 Pertinência dual	142
5.1.2.4.4 Perda de significado geométrico	143
5.1.2.5 Experimentos não realizados.....	146
5.1.2.5.1 FVA do problema dual	146
5.1.2.5.2 MOMA.....	147
5.1.2.6 Conclusões: Caso II	148
6 CONCLUSÃO	149
6.1 CONCLUSÕES FINAIS	149
6.2 AS FALHAS DE OPTKNOCK.....	149
6.3 RECOMENDAÇÕES	151
6.4 POSSÍVEIS EXPLORAÇÕES.....	153
6.5 PRÓXIMOS PASSOS	154
6.5.1 CSOM Dinâmico	154
6.5.2 Resultados redundantes.....	155
REFERÊNCIAS	156
ANEXO A – SLATER CQ EM LP	164
A.1 SLATER CQ EM BIOLOGIA DE SISTEMAS	165
ANEXO B – DUALIDADE EM LP.....	167
ANEXO C – MPCC EM CSOM	171
ANEXO D – BILINEARIDADES EM CSOM	174
D.1 OPTKNOCK.....	175
D.2 ROBUSTKNOCK	177
D.3 REACKNOCK	178
ANEXO E – LISTAS ADICIONAIS	180
APÊNDICE A - RESTRIÇÕES A TOPOLOGIA EM CSOM E GPR	182
A.1 RESTRIÇÕES TIPO I	182
A.2 FVA – TIPO I	183
A.3 RESTRIÇÕES TIPO II	183
A.4 FVA – TIPO II	183

A.5 TERMODINÂMICA	184
A.6 ENSAIOS EMPÍRICOS	185
A.7 GPR	185
A.8 RESTRIÇÕES BOOLEANAS (CONVERT <i>ET AL.</i> , 2001)	186
A.9 RESTRIÇÕES BOOLEANAS REPRESENTADAS COMO INEQUAÇÕES (SHLOMI <i>ET AL.</i> , 2007).....	188
A.10 RESTRIÇÕES BOOLEANAS REPRESENTADAS COMO FALSAS REAÇÕES (ZHANG <i>ET AL.</i> , 2015)	189
A.11 RESTRIÇÕES BOOLEANAS REPRESENTADAS COMO EXPANSÃO DA MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA (MACHADO <i>ET AL.</i> , 2016) .	191
A.11.1 <i>Parsimonious Flux Balance Analysis (pFBA)</i>	191
A.11.2 <i>Comparações (MACHADO et al., 2016)</i>	192
A.11.3 <i>Pontos positivos e negativos</i>	194
A.11.4 <i>Sugestões</i>	196
APÊNDICE B – DEMAIS CSOM-MP-K	198
B.1 OPTGENEKNOCK (ZHANG <i>ET AL.</i> , 2015)	198
B.2 EGKNOCK (XU, 2019).....	199
B.3 GCOPT (ALTER E EBERT, 2019)	200
B.4 AERITH (SHIRAI E KONDO, 2022).....	201

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos, conhecidos também como bioprocessos, representam uma fração significativa dos processos industriais. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) estima que, até 2030, 35% de produtos serão supridos por indústrias de biotecnologia (MAIA *et al.*, 2016). Alguns desses produtos são, atualmente, viáveis somente por via bioquímica (e.g., leite sem lactose (JELEN e TOSSAVAINEN, 2003) e insulina (BAESHEN *et al.*, 2014)), enquanto outros competem com vias químicas (e.g., produtos derivados do petróleo como: plásticos (SILVA *et al.*, 2004), álcoois (HIRAYAMA *et al.*, 1998; MULLER *et al.*, 2015; SHEN e LIAO, 2008) e demais combustíveis, como diesel (RODIONOVA *et al.*, 2017)). Devido aos altos custos associados, principalmente, à purificação, ao custo da matéria-prima e/ou ao pré-processamento, muitos bioprocessos não chegam à produção em escala industrial (CHOI *et al.*, 2019).

O melhoramento de cepas se torna um protagonista nesse cenário, dado que o desempenho individual da menor unidade produtiva, conotado ainda como “coração do bioprocessos” (i.e., a célula microbiana), deverá ser expandido a fim de competir com os processos químicos. Embora existam esforços para tal, não é raro que projetos de engenharia metabólica falhem, em estágios iniciais, ao se depararem com problemas práticos da produção em escala industrial (LEE e KIM, 2015). O melhoramento de cepas através de técnicas de mutagenese por “tentativa e erro” (e.g., raios X e raios UV) já se apresentaram como bem-sucedidas. Um exemplo é a produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum*, que aumentou em mais de mil vezes quando comparada à cultura original de Fleming (ELANDER, 2003). No entanto, tal abordagem, além de não contribuir com conhecimento quanto aos mecanismos genéticos e metabólicos, tampouco é viável em termos de tempo, recursos financeiros e humanos (i.e., uma mutação desejada pode levar meses, demandar milhares de cultivos e ainda assim não chegar a um resultado satisfatório) (HONG e NIELSEN, 2012).

Técnicas de manipulação genética (e.g., plasmídeo suicida (MCQUISTON *et al.*, 1997) e *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) (REDMANE *et al.*, 2016)), tal como de sequenciamento (SANGER *et al.*, 1977) apresentam uma evolução notável da capacidade de provocar mutações pontualmente e estender o limiar do conhecimento dos processos biológicos. Por conseguinte, em seu estado-da-arte, essas técnicas conseguem identificar e, se necessário, deletar um determinado gene para fins industriais. No entanto em

qual, ou em quais, alvo(s) as deleções devam incidir é um ponto que merece mais atenção, portanto, objeto de estudo.

Baseado na Análise de Balanço de Fluxos (*Flux Balance Analysis*, FBA), BURGARD *et al.*, 2003, sugeriram um algoritmo pioneiro intitulado OptKnock. Esse é capaz de, considerando, inicialmente, um viés biológico (função objetivo biológica), maximizar o fluxo de um produto desejado (função objetivo industrial) através da deleção de um dado número de reações. Resumidamente, o algoritmo balanceia o fluxo de carbono entre a formação de biomassa e a formação de produto, através de deleções, de forma ótima. Sendo assim, é possível obter um arranjo ótimo de deleções capazes de satisfazer uma função objetivo industrial por experimentação *in silico*.

O algoritmo é baseado em um modelo conhecido como *Bilevel Programming Problem* (BLPP, ou somente bilevel), que garante que o “elo” que permite que o substrato possa ser redirecionado tanto para a biomassa como para o produto seja preservado. Esse “elo” é conhecido como acoplamento, que é explorado pelos algoritmos *Computational Strain Optimization Models* (CSOM), tal como o OptKnock.

BURGARD *et al.*, 2003 sugeriram uma forma de contornar o BLPP, que carece de *solvers* para sua resolução, representando-o através de um LP. A abordagem foi questionada por falta de uma descrição mais detalhada. O estudo apresentado por XU *et al.*, 2013 não se limitou a pontuar o problema, o mesmo apresentou resultados contundentes que corroboram as suas críticas. Os autores do OptKnock responderam apresentando um estudo revisado do algoritmo (CHODHURY *et al.*, 2015), muito embora desacompanhado da descrição matemática inicialmente questionada.

O OptKnock, em seus 20 anos desde a publicação, foi responsável por cunhar o termo CSOM e influenciar futuros estudos, que sugeriram diversos algoritmos. Esses se basearam na mesma estrutura cuja descrição matemática não foi apresentada, sendo possível questionar se os resultados obtidos entre o BLPP e a sugestão de BURGARD *et al.*, 2003 são de fato coerentes. Isto é, se o resultado obtido pelos autores de fato corresponde ao problema inicialmente concebido.

O presente trabalho tem como objetivo estudar se o acoplamento é preservado em CSOM (dentro da abordagem de BURGARD *et al.*, 2003, chamado aqui de significado matemático). Caso negativo, em quais condições ele é, ou não, preservado. Para tal foram propostas descrições matemáticas que embasaram algoritmos de pós-processamento (PPA) a fim de verificar que as condições de otimalidade foram alcançadas. Não obstante, os PPA investigaram a região viável dos BLPP e sua representação simultânea, conhecida também por

Mathematical Programs with Complementarity Constraints (MPCC). Foram considerados experimentos *in silico* com nove funções objetivo industriais e diferentes formulações matemáticas.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivos principais

- I) Verificar o acoplamento em algoritmos do tipo OptKnock. Em outras palavras, a correspondência entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e de Kuhn-Tucker de um problema interno do BLPP (chamado de significado matemático);
- II) Descrever analiticamente, quando possível, as condições de otimalidade do problema interno do BLPP;
- III) Verificar se a formulação sugerida por BURGARD *et al.*, 2003 é coerente com o BLPP em termos de região viável e otimalidade.

2.1.2 Objetivos secundários

- i) Listar condições em que o acoplamento (significado matemático) não é respeitado;
- ii) Sugerir algoritmos de pós-processamento para verificação das condições de otimalidade e acoplamento;
- iii) Sugerir algoritmos de pós-processamento para verificação da região viável de ambos os problemas BLPP e LP sugerido;
- iv) Identificar possíveis erros no OptKnock que podem ter sido herdados por algoritmos que se basearam no mesmo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As seções subsequentes apresentam, de forma resumida, tópicos relevantes para o presente manuscrito com viés de biologia de sistemas. Em algumas delas são deduzidas, rapidamente, as equações consideradas mais importantes. Algumas seções possuem anexos associados às mesmas, nesses casos são apresentados resultados teóricos não encontrados comumente na literatura. Ao contrário das seções, que são apenas uma revisão, os anexos são fortemente recomendados, mesmo para leitores familiarizados com os temas.

O Anexo A – Slater CQ em LP, apresenta uma dedução que um LP pode ser forçado a respeitar a Slater CQ apenas por transitar entre restrições de desigualdade e igualdade sem perda de generalidade.

O Anexo B – Dualidade em LP, apresenta diversas deduções: (i) uma família de funções objetivo duais. (ii) Condições necessárias para a dualidade forte. (iii) Propriedades importantes para a dualidade forte em LPs.

O Anexo C – MPCC em CSOM, apresenta a metodologia, de forma resumida, para obtenção de um MPCC a partir de um BLPP, incluindo o caso linear. São apresentadas ainda possíveis falhas da abordagem.

O Anexo D – Bilinearidades em CSOM, apresenta o porquê do uso de variáveis binárias na formulação de algoritmos CSOM, os entraves enfrentados pelo uso das mesmas e, por fim, como a literatura resolve esse problema.

O Anexo E – Listas Adicionais, apresenta duas listas: (i) lista dos arquivos suplementares, em que existe a relação dos resultados e suas tabelas em planilhas eletrônicas. (ii) Lista de equações. No decorrer do texto as equações são numeradas, porém é comum que sejam associadas a um nome (e.g., FBA). Essa relação está disponível nessa lista.

O Apêndice A consta de informações adicionais, que foram revisadas e consideradas relevantes para a avaliação de trabalhos futuros. Sua leitura complementa a compreensão de alguns algoritmos CSOM apresentados no Apêndice B.

O Apêndice B apresenta algoritmos CSOM, que o presente manuscrito não fez uso para basear os experimentos. Dado que são importantes para a revisão, mas não para desenvolvimento, constam no apêndice.

3.1.1 Fluxômica

Os algoritmos que visam sugerir alvos ótimos de deleção, ou o arranjo deles, dependem de uma descrição matemática do metabolismo. O mesmo é notoriamente conhecido por sua complexidade e dimensões substancialmente grandes. Por exemplo, um modelo genômico (*Genomic Scale Metabolic Model*, GEM) de *Escherichia coli*, cepa K-12, cultivada em meio MG-1655 (FEIST *et al.*, 2007) possui 2382 reações (modelo *iAF1260*). Uma abordagem cinética demandaria a descrição da lei cinética de cada uma dessas reações, que estão sujeitas às regulações fisiológicas, concentrações de diversos metabólitos, bem como à dinâmica do meio extracelular.

Apesar da dificuldade mencionada, existem tentativas de modelos cinéticos estruturados na literatura em escala não genômica (RIZZI *et al.*, 1997; THEOBALD *et al.*, 1997), que apresentaram um desvio considerável para coenzimas importantes do metabolismo (e.g., ATP, ADP e NADH). Estudos cinéticos, como os acima mencionados, dependem da estimação de parâmetros, que, por conseguinte, dependem da medida de metabólitos internos. Apesar do estado-da-arte apresentar ferramentas capazes para tal (e.g., *microarray* (BARBULOV-NAD *et al.*, 2006), PCR-RT (BUSTIN *et al.*, 2005)), não necessariamente a aquisição de dados é isenta de influência em um experimento *in vitro*, ou ainda demanda a destruição da amostra (e.g., cromatografia e eletroforese). Dadas as incertezas nas medidas, a estimação de parâmetros, nesse contexto, é onerosa em termos de tempo, difícil, se não experimentalmente impossível em alguns casos (SMALLBONE e SIMEONIDIS, 2009).

Uma opção seria conduzir experimentos cinéticos *in vitro* ao invés de *in vivo*, uma vez que a cinética microbiana é viabilizada por enzimas, e as mesmas são biologicamente ativas (i.e., catalisam a reação) mesmo em ambiente extracelular. No entanto, TEUSINK *et al.*, 2000 mostraram um resultado já esperado: as condições termodinâmicas no ambiente intracelular são diferentes do extracelular, sendo assim, a cinética não é a mesma *in vitro* e os resultados provavelmente serão diferentes quando comparados com a condição *in vivo*.

Uma alternativa é considerar a estequiometria ao invés da cinética, que eliminaria completamente os dois principais problemas: (i) a estimação de parâmetros e (ii) o ajuste de parâmetros da lei cinética. A fim de ilustrar, de forma breve, como são obtidos os modelos a seguir, considera-se o seguinte balanço de massa (Equação 1) considerando como volume de controle o contorno de uma célula:

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{R} \cdot V(t) + \mathbf{q}_i(t, V) - \mathbf{q}_o(t, V) \quad (1)$$

Em que $\dot{\mathbf{x}}$ é a variação temporal da massa de metabólitos internos, \mathbf{R} é uma matriz com informações das reações cinéticas, V é o volume da célula, \mathbf{q}_i é a vazão mássica de entrada de metabólitos e \mathbf{q}_o a saída dos mesmos. Note-se que é possível fazer algumas considerações: (i) estado pseudo-estacionário, (ii) que toda a informação cinética seja simplificada à estequiométrica, (iii) atribuir reações artificiais de forma a incorporar entradas e saídas. Sendo assim, tem-se a Equação 2:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{0} \quad (2)$$

Em que \mathbf{S} é a matriz estequiométrica com m metabólitos e n reações, $\mathbf{S} \in \mathbb{R}^{m \times n}$, e \mathbf{v} é o vetor (coluna) dos fluxos reacionais, e $\mathbf{v} \in \mathbb{R}^n$. Observa-se que a matriz estequiométrica tende a ser esparsa e com valores relativamente pequenos (i.e., a maioria deles entre 0 e 1). A mesma pode ser obtida pelo GEM a fim de identificar os genes que um dado microrganismo possui e assim saber a qual enzima esse está associado (algoritmos responsáveis por essa etapa não são apresentados no presente manuscrito). Não obstante, a matriz \mathbf{S} , geralmente, é mal condicionada.

As considerações supracitadas afetam a Equação 1 da seguinte forma: (i) torna a derivada temporal igual zero ($\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{0}$), simplificando o problema de um sistema de equações algébrico-diferenciais, em um sistema de equações algébricas. Note-se que o segundo é muito mais simples de se resolver numericamente que o primeiro. Em contrapartida, da forma descrita, se perde a dependência com o tempo, sendo assim, a resposta no tempo é constante, e, portanto, o perfil de concentração ao longo do tempo não é descrito por essa equação (estado pseudo-estacionário). (ii) A matriz estequiométrica fornece limites físicos para cada reação, ou seja, é fisicamente impossível que uma reação produza mais que a quantidade de mols especificada pela matriz estequiométrica. (iii) As reações artificiais aumentam o número de variáveis do problema (i.e., reações que ocorrem no interior da célula), porém eliminam especificações de entrada e saída. Aliada à primeira consideração, elimina-se também a necessidade de se modelar o volume da célula, algo relativamente difícil de se especificar.

Existem consequências indiretas relacionadas às três considerações: (i) dado que o perfil temporal é desconsiderado, oscilações de temperatura, fenômenos de transporte, princípios físico-químicos (e.g., propriedades cinéticas, balanço redox, pressão osmótica), são todos desconsiderados e incorporados, indiretamente, no vetor dos fluxos reacionais. Observa-se ainda que, para experimentos *in silico*, esses fenômenos são desprezados. (ii) Não existe um custo para que um metabólito entre ou saia da célula, tampouco existe custo para que uma

reação seja catalisada, muito embora isso não seja verdade na prática. Para fins ilustrativos, considera-se que uma reação reversível é convertida em 2 irreversíveis, em sentidos contrários (estratégia praticada em alguns algoritmos). É possível que o fluxo de uma delas seja nulo a fim de representar o fluxo líquido, ou ainda que ambas possuam valores substancialmente altos, porém respeitando o fluxo líquido. Note-se ainda que, em ambos os casos, a situação pode não representar a realidade (i.e., a célula pode assumir outros valores de fluxos individuais para atingir um dado fluxo líquido). (iii) Como observado no último exemplo, o resultado de ν não é único. Geralmente $n > m$ (i.e., existem mais reações do que metabólitos), sendo assim, existe uma base que compreende todos os infinitos resultados possíveis de ν que respeitam o sistema homogêneo. Essa característica não é vista como uma desvantagem por alguns autores: PRICE *et al.*, 2004 argumentam que a possibilidade de mais de um resultado corrobora com a noção biológica de fenótipos silenciados. Diferente da físico-química, no contexto presente, resultados não únicos são esperados (e desejados).

Uma conclusão importante da Equação 2 é que a mesma define um espaço de soluções possíveis. Esse pode ser descrito, matematicamente, como uma base incompleta denotada como espaço nulo (*nullspace*) ou núcleo (*kernel*). O espaço nulo, geometricamente, pode ser classificado como um poliedro. Na seção subsequente existe uma descrição mais apropriada, e uma síntese da importância do mesmo. Esse espaço pode ser explorado através de um viés (*bias*), ou seja, é possível escolher um resultado específico com base em alguma condição.

Essa abordagem é conhecida como fluxômica, uma vez que as unidades da variável na Equação 2 são relativas ao fluxo. Dessa forma é possível representar o metabolismo, muito embora com as ressalvas supracitadas.

3.1.1.1 Análise de Balanço de Fluxo (FBA)

O espaço nulo da matriz estequiométrica define, matematicamente, uma base incompleta em que todos os fluxos reacionais possíveis podem ser descritos. Note-se que é possível que esses fluxos sejam limitados por um dado valor de referência (e.g., obtidos experimentalmente), ou ainda um valor arbitrariamente grande. Essas informações são assimiladas pelo modelo por inequações, as quais viram restrições no modelo final. Note-se ainda que para reações irreversíveis esse limite deve permitir somente ou valores positivos ou

negativos, enquanto para reações reversíveis, existe a possibilidade de se assumir valores negativos e positivos.

$$\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \quad (3)$$

Em que \mathbf{LB} e \mathbf{UB} definem o limite inferior e superior. Esses podem ser especificados por experimentos empíricos ou ainda por outras ferramentas, como por exemplo a *Flux Variability Analysis* (FVA). No entanto, o padrão em repositórios, é propor um valor arbitrariamente grande.

Por fim, o espaço a ser explorado é a intersecção entre o espaço nulo da matriz estequiométrica e os limites de reação, dessa forma tem-se definido pela Equação 4:

$$FS := \{\mathbf{v} \in \mathbb{R}^n | \mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{0}, \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}\} \quad (4)$$

Entende-se FS , *Feasible Solutions*, como conjunto de soluções possíveis da fisiologia de um dado GEM. Note-se que FS se trata de todos os fluxos fisicamente possíveis que um GEM pode assumir. Na prática, existem valores em FS que são biologicamente impossíveis, mas fisicamente possíveis (e.g., um microrganismo não é apto a sobreviver em elevada concentração de etanol, muito embora a estequiometria permita que isso ocorra).

Se o espaço FS for explorado pela maximização da biomassa, obtém-se o modelo conhecido como FBA (Equação 5):

$$\begin{array}{ll} \max & v_{bio} = \mathbf{c}^t \mathbf{v} \\ \mathbf{v} & \\ \text{s. t.} & \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\ & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\ & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \end{array} \quad (5)$$

Em que v_{bio} é um escalar que representa o fluxo de reação responsável pela formação de biomassa. Note-se que a reação de formação de biomassa é artificial e conta com elementos essenciais para a formação de um grama de biomassa seca. Os valores obtidos para o vetor dessa reação foram estimados pela primeira vez por NEIDHARDT, 1996.

A hipótese da maximização da biomassa (ou “função objetivo biológica”) tem raízes no trabalho de DARWIN, 1859, que assume que os organismos vivos evoluíram para maximizar suas chances de sobrevivência. É sabido que, em determinadas situações, organismos vivos podem assumir outras “funções objetivos”. Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, que pode ter seu metabolismo ditado pelo efeito Crabtree, produzindo quantidades relevantes de etanol mesmo em aerobiose, de forma “irracional” quando comparado ao viés proposto por Darwin (PEREZ-SAMPER *et al.*, 2018; POSTMA *et al.*, 1989). Caso assumam-se a maximização de outro fluxo objetivo, a maximização de um fluxo desejado (ou “função objetivo industrial”), tende a vir com uma restrição de formação de biomassa mínima (e.g., no mínimo 95% da

velocidade formação de biomassa teórica). Essa restrição representa uma viabilidade mínima a ser considerada.

Existem evidências biológicas plausíveis para se assumir a maximização da biomassa como função objetivo biológica. Um ensaio empírico que corrobora esse argumento é o proposto por BURGARD e MARANAS, 2003, através do algoritmo *ObjFind* (não apresentado neste trabalho). Um destaque é a distância euclidiana elevada ao quadrado da diferença entre os fluxos experimentais e os estimados, que foi de $0,016 \text{ (mmol/g DW h)}^2$ (em que DW, *Dry Weight*, representa biomassa em massa seca) em condição de aerobiose. Em outras palavras, a distância quadrática entre os fluxos do experimento simulado e do obtido empiricamente pode ser classificada como pequena o suficiente. Os autores argumentam que o resultado contou com uma participação de 58% da formação da biomassa. Esse valor pode ser considerado razoável para a proposta do FBA. Sendo assim, se torna igualmente razoável assumir que o microrganismo tende a maximizar a formação de biomassa em condições de cultivo.

Note-se que, como resultado do FBA, obtém-se \bar{v}_{bio} e \bar{v} , ou seja, a formação máxima teórica de biomassa e a distribuição dos fluxos (representado pela barra superior), que pode ser não única. Caso a função objetivo fosse outra, como por exemplo, a maximização de um produto (e.g. etanol), se obteria a formação máxima teórica desse produto, e uma distribuição de fluxos para tal (que também pode ser não única).

3.1.1.2 Análise de Variabilidade de Fluxo (FVA)

O mesmo espaço viável (Equação 4) pode ser explorado pelo FVA. Essa técnica retorna os limites reacionais máximos e mínimos para cada reação. Pode ainda ser interpretado como o rendimento máximo e mínimo teórico. Neste caso:

$$LB_i \leq v_i \leq UB_i \quad (6)$$

Em que o subíndice i é atribuído a um dado fluxo, ou seja, $I = \{i \in \mathbb{N} | 1 \leq i \leq n\}$. Geralmente o limite desse fluxo pode ser uma porcentagem da biomassa (se esse for o fluxo escolhido). Por exemplo: a reação de formação de biomassa (i_{bio}) é comum que $LB_{i_{bio}} = 0$ e $UB_{i_{bio}} = M$, em que M é um número positivo, não nulo e arbitrariamente grande. No entanto, para a FVA, supõe-se um $LB_{i_{bio}} = \alpha v_{bio}$ (note-se que v_{bio} geralmente é estimado por FBA),

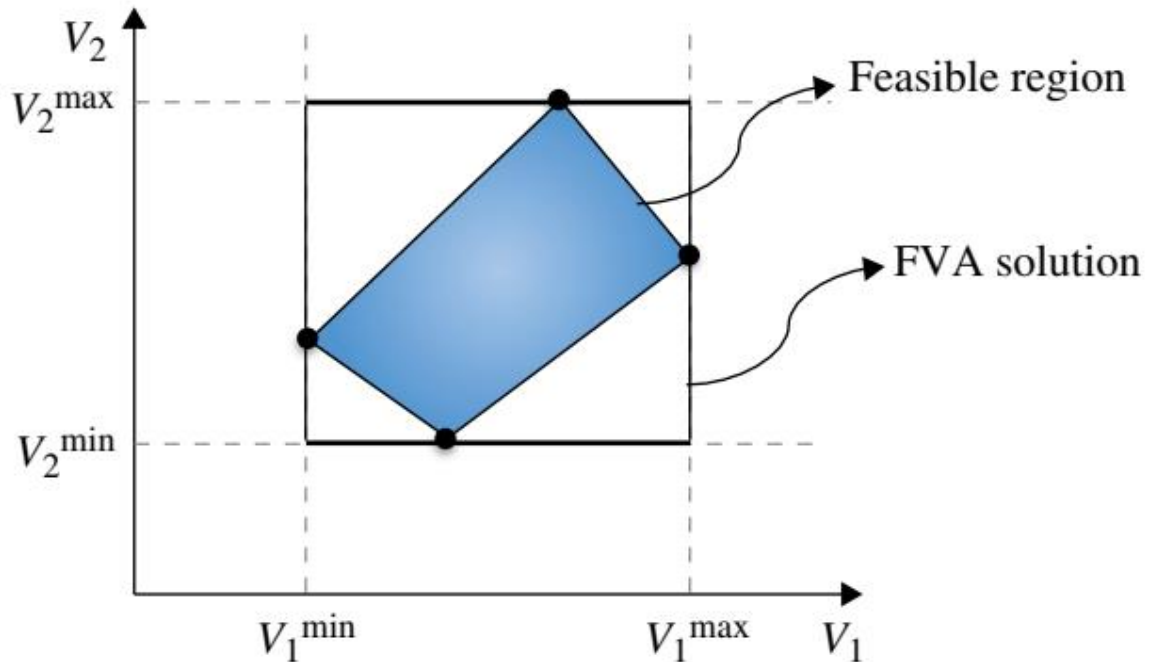
em que α é um número entre zero e um (escolhido arbitrariamente). A restrição $\alpha v_{bio} \leq v_i \leq M$ é considerada no problema atualizando os valores numéricos de **LB** e **UB**.

$$\begin{array}{ll}
 \min/\max & v_i = \mathbf{c}^t \mathbf{v} \\
 \mathbf{v} & \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0} \\
 & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
 \end{array} \quad (7)$$

O vetor \mathbf{c}^t é tal que fornece somente um fluxo v_i e o problema é resolvido duas vezes (maximização e minimização) para cada i (i.e., para cada reação da matriz estequiométrica \mathbf{S}), totalizando $2n$, em que n é o número de reações. Apesar de muito similar ao FBA existem diferenças essenciais entre ambos, tal como os resultados obtidos.

O objetivo do FVA é obter os valores mínimos e máximos de cada fluxo da rede metabólica para um dado α . Por exemplo: se um microrganismo obtiver fluxo de biomassa igual a 95% do teórico, o FVA entregaria o intervalo possível de cada um dos outros fluxos (sendo necessário resolver o problema 2 vezes para cada fluxo) dada essa condição. Esses intervalos tendem a ser mais restritos que os assumidos inicialmente, ou seja, o resultado final do FVA é um subconjunto menor ou igual ao que foi sugerido inicialmente ($\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$). A Figura 1 retrata graficamente a interpretação de um FVA.

Figura 1 – Representação gráfica de um FVA



Como apresentado na Figura 1, destacado em azul, *Feasible region*, é a região (viável) em que existem fluxos fisicamente factíveis para as restrições impostas. A solução do FVA, *FVA solution*, são limites reacionais que contém toda a região viável. Dado que a solução maximiza (e minimiza) individualmente cada reação é natural que existam pontos em que o FVA retorna um resultado que só é viável em condições específicas. Observa-se que, por exemplo, o ponto (V_1^{max}, V_2^{min}) são duas soluções do FVA (i.e., maximização de V_1 e minimização de V_2), porém ambas juntas não são viáveis. Isso pode ser interpretado, no contexto biológico, como uma limitação da fonte de carbono: não existe fluxo de carbono para suprir uma estratégia metabólica que fixe ambos os fluxos no ponto (V_1^{max}, V_2^{min}) .

A principal importância dessa análise é restringir ainda mais o conjunto de soluções *FS*, facilitando assim a inspeção do mesmo. Espera-se que, fazendo uso dessa ferramenta, análises da rede metabólica subsequentes sejam obtidas mais rapidamente. Note-se que, dessa forma, o FVA sempre tem caráter restritivo da topologia de *FS* através dos limites de reação. Adicionalmente, valores desconsoantes com as dimensões do problema (e.g., enquanto o fluxo de glicose é da ordem de 10^1 existem limites reacionais da ordem de 10^5 , algo comum em modelos disponíveis em repositórios) podem interferir negativamente em análises de pós-processamento.

3.1.1.3 MOMA

A escolha da função objetivo no FBA, hipótese da maximização da biomassa, tem suas raízes no trabalho de Darwin, como discutido anteriormente. Porém, ao se realizar qualquer tipo de mutação, não existe garantias de que o microrganismo tenha o mesmo viés proposto pelo FBA. *Minimization of Metabolic Adjustment* (MOMA) foi sugerido por SEGRE *et al.*, 2002, e propõe que o mutante iria ajustar seu fluxo para o mais próximo possível de sua condição selvagem.

$$\begin{array}{ll}
 \min_{\mathbf{v}} & \mathbf{g}(\mathbf{v}^{wt}, \mathbf{v}) \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0} \\
 & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
 \end{array} \tag{8}$$

Em que \mathbf{v}^{wt} representa o fluxo da linhagem selvagem (podendo ser obtido por FBA do espaço *FS* selvagem, e não necessariamente através de experimentos). A função \mathbf{g} é tal que

$g: FS \rightarrow \mathbb{R}$, e representa a distância entre dois pontos. O artigo original sugere a minimização da distância euclidiana, no entanto a sugestão de outras métricas não euclidianas para a função objetivo também é recomendada pelos autores.

Uma das aplicações imediatas do MOMA é a verificação de reações essenciais para a formação da biomassa (i.e., se essas reações forem deletadas, o microrganismo se torna incapaz de se reproduzir, e, portanto, de produzir biomassa). No estudo pioneiro, os autores argumentam que o MOMA detectou mais alvos, ditos na literatura como letais, que o FBA. Os autores argumentam ainda que a abordagem proposta prevê os fenótipos de mutantes com eficiência.

A exploração do espaço FS , segundo um viés (função objetivo), pode impactar a interpretação proposta de forma negativa. SHLOMI *et al.*, 2005 argumentaram que, devido ao fato de minimizar a distância euclidiana, o fenótipo mutante pode preferir pequenas mudanças ao invés de uma única grande mudança de rota. Os autores citam um estudo empírico a fim de endossar seu argumento (IHMELS *et al.*, 2004), juntamente com sua proposta de algoritmo similar ao MOMA: *Regulatory On/Off Minimization* (ROOM, não apresentado neste trabalho).

Diferente do MOMA, o ROOM possui dois parâmetros a serem especificados pelo usuário. Esses parâmetros, arbitrários, operam em parceria com variáveis binárias. Quando uma dessas se torna ativa (i.e., intervenção), o algoritmo redefine os limites reacionais para valores mais restritos (que dependem dos parâmetros). Quando a mesma é inativa, o algoritmo possui os mesmos limites reacionais definidos no espaço FS . O ROOM procura maximizar o número de intervenções nos limites reacionais, logo, realizando diversas alterações nesses. Quanto maior o número de intervenções, mais distante da cepa selvagem o mutante se encontra. Dessa forma, não importa a magnitude da intervenção e sim se ela existe ou não. Existe ainda a opção de fixar os parâmetros em zero e enxergar essa regulação como uma graduação entre regulação “desligada” e “ligada” (i.e., transformar as variáveis binárias em contínuas).

Resumidamente, os resultados encontrados por SHLOMI *et al.*, 2005, mostram que o MOMA prevê alvos de letalidade melhor em regimes transientes, no entanto, para regimes em estado estacionário, ambos o ROOM e o FBA obtiveram melhores resultados.

Os resultados de ambos os artigos são conflitantes e usam, supostamente, a mesma rede metabólica. Isso se deve, provavelmente, às pequenas alterações que ambos os autores propõem antes de aplicar o algoritmo proposto (i.e., pré-processamento). Adicionalmente, existem diferenças consideráveis entre a metodologia de ambos para verificar a letalidade em deleções. Não é possível afirmar que um algoritmo é melhor que o outro.

3.1.2 Modelos metabólicos

As informações para construção do conjunto soluções viáveis FS estão contidas no GEM. Os GEMs, por sua vez, podem ser encontrados em repositórios (*databases*) como o BiGG (KING *et al.*, 2016, disponível em: <http://bigg.ucsd.edu/>, acesso em 15/07/2023). O mesmo disponibiliza o GEM, devidamente anotado, de diversos microrganismos.

Essa anotação, minimamente, contém a matriz estequiométrica (S), os limites reacionais (LB, UB), anotações a respeito de reações e metabólitos, subsistemas a que as primeiras pertencem (e.g., reações do ciclo do ácido cítrico, reações de transporte) e relação de genes e reações. Note-se, para esse último, a quantidade de genes considerada é inferior ao reportado na literatura, provavelmente por aguardarem elucidação. A título de comparação, o GEM do modelo *iJN1463* (*Pseudomonas putida* KT2440) possui somente 1462 genes, enquanto outro repositório (*Pseudomonas Genome DB*, WINSOR *et al.*, 2016) apresenta que existem 5729 genes anotados para a mesma cepa.

Os GEMs, geralmente, estão disponíveis em diversas extensões, algumas vezes dispensando algoritmos de terceiros para construção das variáveis em *softwares*. É possível usar funções implementadas no COBRA *toolbox* (HEIRENDT *et al.*, 2019) a fim realizar a reconstrução do GEM. Por último, note-se que é comum encontrar a extensão correspondente ao *workspace* do MATLAB (The MathWorks, Natick, MA), dispensando qualquer outro algoritmo ou *software*.

3.1.3 Programação matemática

Os problemas formulados anteriormente (e.g., FBA, FVA e MOMA), são problemas de otimização, que podem ser resolvidos por programação matemática. Note-se que o FBA e o FVA são problemas em que as restrições são lineares, tal como a função objetivo (que se deseja maximizar ou minimizar), logo problemas lineares. O MOMA, canonicamente, é um problema

quadrático. Em outras palavras, esse tipo de problema possui o objetivo de escolher a melhor solução possível por um critério (i.e., função objetivo), em uma dada região (i.e., nesse caso, as soluções viáveis do conjunto FS). No presente manuscrito somente foram abordados problemas convexos e lineares.

As subseções subsequentes foram baseadas, principalmente, no livro *Nonlinear Programming: Theory and Algorithms* (BAZARAA *et al.*, 2013), com grandes influências de outros livros (IGNIZIO e CAVALIER, 1994; FLOUDAS, 1995; SCHRIJVER, 1998; BOYD e VANDENBERGHE, 2004; BIEGLER, 2010).

É possível verificar que a maioria das referências são focadas em problemas não lineares, muito embora em biologia de sistemas se trabalhe muito com problemas lineares. Isso se deve pela escassez de literatura sobre os temas estudados nas seções subsequentes. Sendo assim, nas seções subsequentes, as deduções se iniciam em programação não-linear, até se abordar a linearidade.

3.1.3.1 Programação linear

Problemas de programação linear (*Linear Programming*, LP) são problemas de maximização (ou minimização) de uma função linear, de $V \rightarrow \mathbb{R}$ (em que V é um subconjunto de \mathbb{R}^n), sobre um poliedro. A região a ser investigada é denominado como região viável (*feasible region*), e a função linear a ser maximizada (ou minimizada) é denominado como função objetivo.

Note-se que o FBA é um problema de programação linear:

$$\begin{array}{ll} \max & v_{bio} = \mathbf{c}^t \mathbf{v} \\ \mathbf{v} & \\ \text{s. t.} & \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\ & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\ & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \end{array} \quad (9)$$

Observa-se que $\mathbf{c}^t \mathbf{v}$ é a função objetivo, a região viável é \mathbb{R}^n . Observa-se que a variável de otimização (aquela que será estimada) é \mathbf{v} . Porém essa é restrita (*s.t.* está para *subject to*, ou sujeito a) ao espaço nulo da matriz estequiométrica ($\mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0}$) e aos limites de reação ($\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$).

O primeiro algoritmo para resolução desse tipo de problema, Simplex, surgiu na década de 40 com Dantzig (DANTZIG, 1990), no entanto traços da ideia de programação linear já estavam presentes no trabalho de FOURIER, 1827.

3.1.3.2 Condições gerais de otimalidade

Problemas de otimização, solucionados por programação matemática, possuem condições para que se verifique se, de fato, o valor encontrado é ótimo. Tomando um problema P de minimização genérico (representado pela Equação 10):

$$\begin{aligned} \min_{\mathbf{x}} \quad & f(\mathbf{x}) \\ \text{s. t.} \quad & \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0} \\ & \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0} \\ & \mathbf{x} \in \mathbb{R}^l \end{aligned} \quad (10)$$

Em que as funções são tais que: $f: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, $g_j: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $J = \{j \in \mathbb{N} | 1 \leq j \leq j_{end}\}$, $h_k: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $K = \{k \in \mathbb{N} | 1 \leq k \leq k_{end}\}$. Note-se que é possível descrever essa região como $X := \{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^l | \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0}, \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0}\}$.

É notável que, caso $f(\bar{\mathbf{x}})$ seja o mínimo do problema P , então não deve existir nenhum outro valor em X que permita um $f(\mathbf{x}) < f(\bar{\mathbf{x}})$. Em outras palavras, não existe um só ponto $\mathbf{x} \in X$ que “aponte” para uma direção em que $f(\mathbf{x})$ é menor que $f(\bar{\mathbf{x}})$, sendo assim tem-se pela Equação 11:

$$\nabla f(\bar{\mathbf{x}})^t (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) \geq 0 \quad \forall \mathbf{x} \in X \quad (11)$$

Se o problema P fosse desprovido de restrições (i.e., tanto $\mathbf{g}(\mathbf{x})$ e $\mathbf{h}(\mathbf{x})$ não existissem, ou se fossem redundantes), é notório que $\nabla f(\bar{\mathbf{x}}) = \mathbf{0}$. No entanto, caso essa condição não seja respeitada, não necessariamente a última afirmação é verdadeira (e.g., o mínimo de $f(x) = x^2$ restrito a $x \geq 2$). Sendo assim, existem condições adicionais a serem elucidadas acerca das condições de otimalidade.

Considera-se a seguinte função, chamada de função lagrangeana:

$$L(\mathbf{x}, \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}) = f(\mathbf{x}) + \mathbf{h}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\lambda} + \mathbf{g}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\mu} \quad (12)$$

Em que $\boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^{k_{end}}$ e $\boldsymbol{\mu} \in \mathbb{R}^{j_{end}}$, em que, ambos, são chamados de multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. A função é tal que $L: Y \rightarrow \mathbb{R}$, em que $Y := \{(\mathbf{x}, \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}) \in \mathbb{R}^{l+k_{end}+j_{end}} | \boldsymbol{\mu} \geq \mathbf{0}\}$. Note-se que os multiplicadores podem ser chamados de

variáveis duais (e por conseguinte possuem significado matemático adicional). Observa-se ainda que cada λ_k está associado a cada h_k , tal como acontece com μ_j e g_j . Sendo assim, cada restrição está associada a seu respectivo multiplicador de Lagrange e de Kuhn-Tucker.

Existem duas principais formas de deduzir as condições de otimalidade a serem apresentadas a seguir: (i) a partir das condições de Fritz John, ou (ii) a partir das qualificações de restrições. Ambas podem ser encontradas nos capítulos 4 e 5 de BAZARAA *et al.*, 2013. Nenhuma delas é apresentada no presente manuscrito.

As condições gerais de otimalidade são apresentadas a seguir:

$$\begin{aligned} \nabla_x L(\bar{x}, \bar{\lambda}, \bar{\mu}) = \nabla f(\bar{x}) + \nabla h(\bar{x})^t \bar{\lambda} + \nabla g(\bar{x})^t \bar{\mu} = \mathbf{0} \\ \bar{\mu}_j \geq 0 \quad j \in J \end{aligned} \quad (13)$$

$$g_j(\bar{x}) \leq 0, h_k(\bar{x}) = 0 \quad j \in J, k \in K \quad (14)$$

$$g_j(\bar{x}) \bar{\mu}_j = 0 \quad j \in J \quad (15)$$

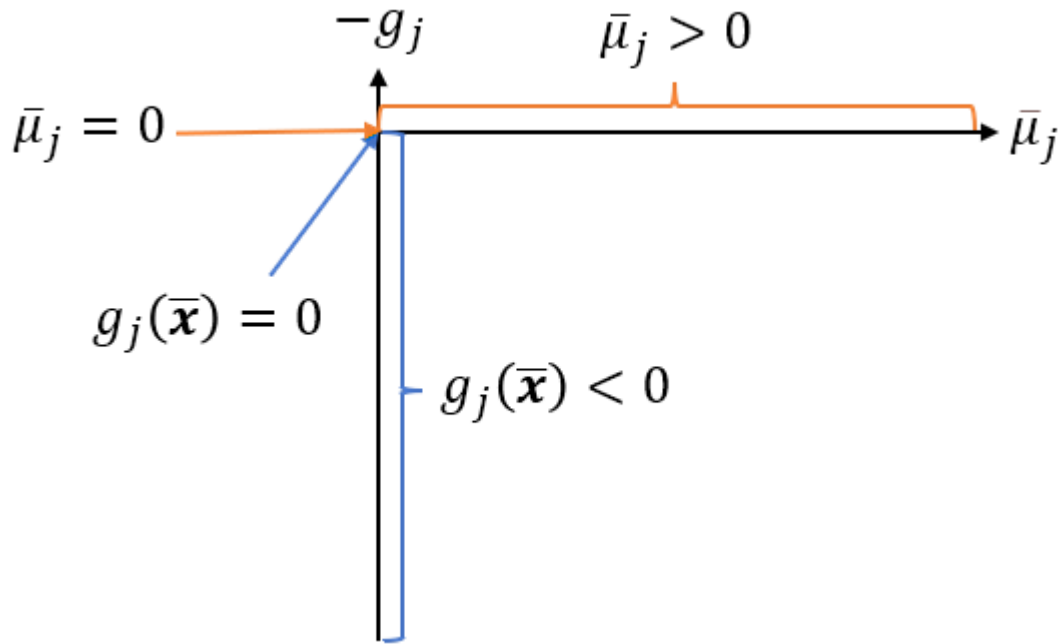
A primeira equação supracitada (Equação 13), remete ao “balanço de forças” entre cada gradiente de restrições. Os multiplicadores agem como “pesos” a fim de satisfazer a equação, note-se que existe um peso unitário para a função objetivo. Tal como apresentado em Y (domínio da função lagrangeana), obriga que $\mu \geq \mathbf{0}$. Apesar da conotação “balanço de forças” (como apresentado em BIEGLER, 2010), a equação é chamada, no presente manuscrito, de *DF* (*Dual Feasibility*). Uma vez que essa é condição necessária para que as variáveis duais tenham correspondência com o problema primal (para maiores informações, verificar o Anexo B – Dualidade em LP).

A segunda equação supracitada (Equação 14), *PF* (*Primal Feasibility*), remete à viabilidade do problema P . Em outras palavras, a solução ótima, \bar{x} , deve respeitar às restrições impostas no problema P .

A terceira equação supracitada (Equação 15), *CS* (*Complementarity Constraints*), remete à relação de complementariedade entre restrições de desigualdade e seu multiplicador de Kuhn-Tucker associado. Uma restrição de desigualdade pode ser tanto uma (i) desigualdade estrita ($g_j(\bar{x}) < 0$) tanto uma (ii) igualdade ($g_j(\bar{x}) = 0$). Para o primeiro (i), tem-se que o multiplicador associado é nulo ($\bar{\mu}_j = 0$), do contrário *CS* é desrespeitada. Nesse caso, a restrição de desigualdade é classificada como “inativa”. Para o segundo (ii), tem-se que o multiplicador associado pode assumir qualquer valor em seu domínio ($\bar{\mu}_j \geq 0$). Para esse último existem interpretações adicionais, se o multiplicador for nulo, então a restrição é chamada de “fracamente ativa”. Caso o multiplicador seja positivo diferente de zero, então a restrição é chamada de “fortemente ativa”.

Uma restrição de desigualdade fortemente ativa pode ser interpretada como uma restrição, que se perturbada, incrementaria, certamente, o valor da função objetivo. Esse conceito é conhecido como *Shadow Price* (não abordado), que, em outras palavras, quer dizer que o ótimo não restrito está além das fronteiras impostas pela restrição de desigualdade em questão. A Figura 2 resume, graficamente, o mencionado acima:

Figura 2 – Exemplo gráfico acerca das restrições de desigualdade



Fonte: Autor

Como apresentado na Figura 2, em azul é possível verificar as possibilidades que uma dada restrição de desigualdade pode assumir. A primeira delas, $g_j(\bar{x}) < 0$, a restrição está inativa, logo, como apresenta o gráfico, $\bar{\mu}_j$ deve ser nulo. A segunda possibilidade é $g_j(\bar{x}) = 0$, a restrição está ativa, nesse caso $\bar{\mu}_j$ pode assumir qualquer valor (apresentados em laranja). Caso o valor ótimo irrestrito esteja exatamente na fronteira delimitada por $g_j(\bar{x})$, então $\bar{\mu}_j = 0$. Caso o valor ótimo irrestrito esteja para além da fronteira delimitada por $g_j(\bar{x})$, então $\bar{\mu}_j > 0$. Note-se que essa representação gráfica é, precisamente, o apresentado em CS, em que cada restrição e multiplicador associado, são, elemento a elemento, perpendiculares.

As três equações, em conjunto, formam as conhecidas Condições Karush-Kuhn-Tucker (Condições KKT). Existem ainda condições de segunda ordem, no entanto, uma vez que o objeto de interesse é programação linear, se torna irrelevante a apresentação de tais condições. É possível encontrar uma descrição matemática adequada no Capítulo 4 de BAZARAA *et al.*, 2013.

3.1.3.3 Qualificação de restrições

Como mencionado na seção anterior, é possível deduzir as Condições KKT por algumas qualificações de restrições (não abordado). Não somente isso, é possível ainda obter diversas consequências a partir das qualificações de restrições (*Constraint Qualification*, CQ). As condições para as qualificações levam em conta o Problema P com alguns conjuntos adicionais:

$$\begin{aligned}
 \min_{\mathbf{x}} \quad & f(\mathbf{x}) \\
 \text{s. t.} \quad & \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0} \\
 & \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0} \\
 & \mathbf{x} \in \mathbb{R}^l
 \end{aligned} \tag{16}$$

Em que as funções são tais que: $f: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, $g_j: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $J = \{j \in \mathbb{N} | 1 \leq j \leq j_{end}\}$, $h_k: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $K = \{k \in \mathbb{N} | 1 \leq k \leq k_{end}\}$. Note-se que é possível descrever essa região como $X := \{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^l | \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0}, \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0}\}$. Considera-se ainda que $J_{off} := \{j | g_j < 0\}$ e $J_{on} := \{j | g_j = 0\}$, em que o primeiro está para os índices j que tornam as restrições de desigualdade g_j inativas, e o segundo que tornam g_j ativas (tanto fracamente quanto fortemente).

3.1.3.3.1 Condição de Slater (Slater CQ)

Considera-se que X é um conjunto aberto, em que $\{g_j | j \in J_{off}\}$ são pseudoconvexas (definição 3.5.10 apresentada por BAZARAA *et al.*, 2013) em $\bar{\mathbf{x}}$ e $\{g_j | j \in J_{on}\}$ sejam contínuas em $\bar{\mathbf{x}}$. Se existe um $\mathbf{x} \in X$ tal que $g_j(\mathbf{x}) < 0$ para $j \in J$, então a condição de Slater é satisfeita (BAZARAA *et al.*, 2013).

É possível ainda sujeitar uma dada solução à Slater CQ, isto é: Considera-se que X é um conjunto aberto, em que $\{g_j | j \in J_{off}\}$ sejam pseudoconvexas em $\bar{\mathbf{x}}$ e $\{g_j | j \in J_{on}\}$ sejam contínuas em $\bar{\mathbf{x}}$, e existe um $\mathbf{x} \in X$ que $g_j(\bar{\mathbf{x}}) < 0$ para $j \in J$. Nesse caso, a solução não é básica (i.e., todas as restrições de desigualdade não são ativas).

Observa-se que, como apresentado em seção subsequente, um LP solucionado por um algoritmo Simplex sempre retorna uma solução básica como resposta. Isso não significa que um LP despreza a Slater CQ, na verdade, o mesmo sempre respeita a mesma, desde que esteja

no dito “formato padrão” (BAZARAA *et al.*, 2013). Esse resultado pode ser encontrado no Anexo A – Slater CQ em LP. No entanto, para isso, mudanças *post hoc* são necessárias.

Caso o problema respeite a Slater CQ, é possível afirmar que a dualidade forte é válida, isto é, não existe *gap* entre as funções objetivo dual e primal. O significado dessa afirmação é explicado na seção 3.1.3.6. Dualidade lagrangeana.

3.1.3.3.2 *Linear Independence Constraint Qualification (LICQ)*

Considera-se somente as restrições ativas, $\{g_j | j \in J_{on}\}$, a LICQ é definida pela independência linear de (BIEGLER, 2010):

$$\nabla g_j(\bar{x}), \quad \nabla h_k(\bar{x}), \quad j \in J_{on}, k \in K \quad (17)$$

Em outras palavras, se o gradiente das restrições de desigualdades ativas e o gradiente das restrições de igualdade forem linearmente independentes pelas linhas, então a LICQ é verificada.

Considera-se que o ponto \bar{x} , do Problema P , seja KKT, se for possível verificar LICQ, então os multiplicadores de Lagrange e de Kuhn-Tucker são únicos. Note-se que a LICQ não é condição necessária para a unicidade dos multiplicadores. Existe ainda uma condição mais branda que a LICQ, que é apresentada na seção a seguir.

Em biologia de sistemas (GEM) a LICQ nunca é verificada, isso se deve pela dependência linear que ocorre nas restrições de igualdade, portanto, na matriz estequiométrica. A mesma possui, como metabólitos, coenzimas, que agem, geralmente, em pares (e.g., NAD e NADH, ATP e ADP, NADP e NADPH), isso faz com que exista uma dependência linear naturalmente. É possível, mesmo assim, eliminar esse problema, porém o custo seria reinterpretar a matriz estequiométrica, e por conseguinte, todo o metabolismo (i.e., inviável).

3.1.3.3 Mangasarian-Fromovitz CQ (MFCQ)

Considerando-se somente as restrições ativas, $\{g_j | j \in J_{on}\}$, a MFCQ é definida pela independência linear das restrições de igualdade. Considera-se ainda que existe uma direção \mathbf{d} tal que (MANGASARIAN e FROMOVITZ, 1967; BIEGLER, 2010):

$$\nabla g_j(\bar{\mathbf{x}})^t \mathbf{d} < 0, \quad \nabla h_k(\bar{\mathbf{x}})^t \mathbf{d} = 0, \quad j \in J_{on}, k \in K \quad (18)$$

Note-se que a MFCQ sempre é satisfeita se a LICQ é satisfeita.

Essa condição garante que os multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker sejam limitados, porém não garante que sejam únicos, como ocorre na LICQ.

Note-se que, tal como a LICQ, a MFCQ geralmente não é satisfeita no contexto de biologia de sistemas.

3.1.3.4 Unicidade

Um problema de otimização pode possuir mais de uma solução, isto é, é possível que as Condições KKT sejam satisfeitas em mais de um ponto da região viável. Esses pontos podem ser ótimos locais e globais, mas essas classificações são irrelevantes para programação linear, já que o resultado ótimo (se existir) é sempre global. Muito embora, mesmo para programação linear, não significa que o vetor ótimo $\bar{\mathbf{x}}$ seja único, ou seja, não necessariamente existe somente uma forma de se obter $\bar{\mathbf{x}}$ (ótimo fraco).

É possível descrever o conjunto de soluções alternativas ótimas pelo Corolário 1 do Teorema 3.4.4 apresentado por BAZARAA *et al.*, 2013:

$$AS_{Primal} := \{ \mathbf{x} \in X | \nabla f(\bar{\mathbf{x}})^t (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) = 0, \nabla f(\bar{\mathbf{x}}) = \nabla f(\mathbf{x}) \} \quad (19)$$

Note-se que AS (*Alternative Set*), no caso linear, limita, apenas, que a função objetivo possua o mesmo valor ($\mathbf{c}^t (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) = 0 \therefore \mathbf{c}^t \mathbf{x} = x_{obj}$). Apesar da Equação 19 descrever quais devem ser esses valores, é impossível (somente por AS) saber a dimensão do conjunto, isto é, quais variáveis em \mathbf{x} podem variar sujeito a $\nabla f(\bar{\mathbf{x}})^t (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) = 0$. Observa-se ainda que a classificação de um ótimo forte obriga que AS_{Primal} seja um conjunto unitário (*singleton*).

Note-se que a definição de *AS* depende da maximização de um problema convexo, ou da minimização de um problema côncavo. Como um LP é sempre convexo e côncavo simultaneamente, essa definição é sempre válida para esse tipo de problema.

Em biologia de sistemas, normalmente os resultados ótimos obtidos são fracos (i.e., degenerados). Isso se deve a, principalmente, dois fatores: (i) a matriz estequiométrica é deficiente tanto pelas linhas e pelas colunas. Por exemplo, é comum que se transite entre reações irreversíveis e reversíveis. Matematicamente, se substitui uma reação reversível por duas irreversíveis (de sentidos opostos, *forward* e *backward*), nesse caso, desde que o saldo líquido seja o mesmo, pode-se variar, infinitamente, os valores de ambas (i.e., degeneração). (ii) O metabolismo possui diversas redundâncias, isto é, vários caminhos que levam ao mesmo destino. Desse modo, as rotas para o resultado ótimo podem ser diferentes e chegar ao mesmo local sem perda de valor para função objetivo.

3.1.3.5 Simplex

O algoritmo Simplex, inicialmente proposto por Dantzig em 1947, é uma procura sistemática de uma solução básica de um LP. O mesmo move-se de ponto extremo em ponto extremo com o intuito de melhorar o valor (seja para maximizar ou minimizar o mesmo) da função objetivo. Note-se que o Simplex não somente resolve um LP, como também foi o primeiro algoritmo a se propor a tal tarefa.

Resumidamente, o algoritmo Simplex, em sua forma padrão, possui apenas restrições de igualdade (que podem ser obtidas mesmo com a presença de restrições de desigualdade por meio de variáveis de folga) e variáveis restritas a valores maiores que zero. Considera-se então uma decomposição da matriz de restrições em uma matriz não deficiente quadrada (chamada de base, e que está relacionada com variáveis básicas) e uma matriz com os demais termos (em que as variáveis são chamadas de não básicas). É possível intercambiar colunas entre ambas as matrizes de forma a obter melhores valores para a função objetivo. Esse mecanismo, em outras palavras, é a inspeção de pontos extremos até que se encontre um ótimo. É possível verificar se o ponto é ótimo pela dualidade forte (ausência de *gap*).

O algoritmo foi melhorado e é usado pelos principais *solvers* comerciais. O funcionamento, na íntegra, do Simplex não é apresentado no presente manuscrito. É possível encontrar exemplos e uma descrição detalhada em BAZARAA *et al.*, 2013 (capítulo 2, seção

7). O principal objetivo em citá-lo é apresentar problemas de performance associados à formulação matemática de um LP.

3.1.3.5.1 Problemas de performance

O algoritmo Simplex é conhecido por conseguir obter uma solução em um número finito de iterações (BAZARAA *et al.*, 2013), porém isso não significa que o mesmo sempre converge. Existem situações especiais em que o algoritmo Simplex pode não convergir ou simplesmente alegar que o problema é inviável (*infeasible*), mesmo quando exista viabilidade.

Nas iterações do Simplex, é possível que a coluna que entra a base não melhore a função objetivo, e isso se repita na iteração seguinte e na próxima retorne à primeira, formando um ciclo sem melhoras da função objetivo. Esse fenômeno, chamado de *cycling*, garante que o Simplex não convirja. Em problemas degenerados, em que a matriz das restrições de igualdade é deficiente, isso também é possível de ocorrer (ELHALLAOUI *et al.*, 2011). Existem técnicas capazes de lidar com o *cycling* (HALL e MCKINNON, 2004), porém podem ser traduzidas somente em um número maior de iterações que podem, simplesmente, não sair do ciclo (BIXBY, 2002). Note-se que problemas de biologia de sistemas, geralmente, são degenerados.

Não obstante, a matriz estequiométrica (gradiente das restrições de igualdade) é mal condicionada. Isso significa que pequenas perturbações numéricas são traduzidas em grandes violações. Essa característica possui sinergismo (negativo) com o *cycling*, podendo retornar um resultado inviável, dada a magnitude da violação das restrições. O resultado, obviamente, não condiz com o problema, se tratando de um problema numérico.

Adicionalmente, uma condição de verificação de viabilidade é a dualidade forte (explicada em detalhes na seção 3.1.3.6.1 e Anexo B). Essa não é respeitada se o problema se encontra em um ciclo. Dessa forma, o problema também pode ser rotulado como inviável nessa situação.

Muito comum na literatura, a fim de seguir o formato padrão do Simplex (não apresentado), é substituir uma variável livre em duas novas, em que cada uma delas representa uma componente, uma positiva e outra negativa:

$$\mathbf{x} = \mathbf{x}^+ - \mathbf{x}^- \quad \mathbf{x}^+, \mathbf{x}^- \geq 0 \quad (20)$$

Nesse cenário, se aumenta o número de variáveis do problema e também se desrespeita a MFCQ para o problema dual, sendo assim, o problema primal possui variáveis não limitadas.

Adicionalmente, a degeneração gerada do lado primal ($\mathbf{x} = \mathbf{x}^+ - \mathbf{x}^-$ obriga duas colunas linearmente dependentes na matriz das restrições de igualdade) conduz o problema dual a não respeitar a Slater CQ. Em outras palavras, esse tipo de metodologia pode tornar um problema bem condicionado em um mal condicionado (IM e HAESOL, 2023). Note-se ainda que a abordagem supracitada é idêntica a realizada em biologia de sistemas ao se converter uma reação reversível em duas irreversíveis.

Por fim, é possível constatar que os LPs em biologia de sistemas são mal condicionados e, geralmente, desafiadores em termos numéricos. Problemas em escala genômica possuem todos os aspectos complicadores acima-mencionados, gradiente das restrições de igualdade: (i) degenerado (i.e., com colunas linearmente dependentes). (ii) deficiente pelas linhas (i.e., com linhas linearmente dependentes). (iii) Mal condicionado.

3.1.3.6 Dualidade lagrangeana

Problemas de programação matemática possuem um outro problema similar associado a eles. O Problema P apresentado acima pode ser chamado de problema primal, enquanto um problema relacionado ao mesmo, pode ser chamado de dual. Em qualificação de restrições específicas é possível relacionar ambos de forma que a função objetivo deles possuam o mesmo valor ótimo. O problema primal é representado pela Equação 21:

$$\begin{aligned} \min_{\mathbf{x}} \quad & f(\mathbf{x}) \\ \text{s. t.} \quad & \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0} \\ & \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0} \\ & \mathbf{x} \in \mathbb{R}^l \end{aligned} \quad (21)$$

Em que as funções são tais que: $f: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, $g_j: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $J = \{j \in \mathbb{N} | 1 \leq j \leq j_{end}\}$, $h_k: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $K = \{k \in \mathbb{N} | 1 \leq k \leq k_{end}\}$. Note-se que é possível descrever essa região como $X := \{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^l | \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0}, \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0}\}$

O problema dual é definido como a Equação 22 apresenta:

$$\begin{aligned} \max_{\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}} \quad & \theta(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}) = \min_{\mathbf{x}} \{f(\mathbf{x}) + \mathbf{h}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\lambda} + \mathbf{g}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\mu} : \mathbf{x} \in X\} \\ \text{s. t.} \quad & \boldsymbol{\mu} \geq \mathbf{0} \end{aligned} \quad (22)$$

Em que $\boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^{k_{end}}$ e $\boldsymbol{\mu} \in \mathbb{R}^{j_{end}}$. Se trata de um problema do tipo max-min (chamado também de *maximin*), em que o problema interno tem como função objetivo a própria função

lagrangeana. Note-se que é possível modificar a interpretação de X , que pode, por conseguinte, modificar o problema dual.

A dualidade é invocada em modelos dos algoritmos CSOM a fim de explorar uma simetria única encontrada somente em problemas do tipo LP.

3.1.3.6.1 Dualidade forte e fraca

Considera-se que $\mathbf{x} \in X$ para o problema primal, em outras palavras, a viabilidade primal. Considera-se ainda a viabilidade dual do problema dual, nesse caso $\boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^{k_{end}}$, $\boldsymbol{\mu} \in \mathbb{R}^{J_{end}}$ e $\boldsymbol{\mu} \geq \mathbf{0}$. Então é possível afirmar que a função objetivo do problema dual é tal que $f(\mathbf{x}) \geq \theta(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu})$ (BAZARAA *et al.*, 2013). Esse teorema é descrito como dualidade fraca, que, em outras palavras, através da função objetivo dual, obtém o menor valor possível para a função objetivo primal. O teorema é válido para toda a região viável do problema primal. Em outras palavras, a função dual delimita o limite inferior da função objetivo primal.

Considerando que a Slater CQ é satisfeita para o problema primal, considerando ainda que as restrições de igualdade sejam afins, é possível verificar a dualidade forte. Nesse caso, o resultado do problema de otimização primal é igual ao resultado do problema de otimização dual. Em outras palavras, na otimalidade, o limite inferior da função objetivo primal condiz com seu resultado. A diferença entre o limite inferior e o resultado da função objetivo primal (i.e., função objetivo primal – função objetivo dual) é chamado de *gap*. Quando a dualidade forte é verificada, o *gap* é nulo.

Considerando-se a dualidade lagrangeana, é possível chamar as variáveis de otimização de variáveis duais, que são iguais aos multiplicadores. Ao longo do manuscrito são apresentadas situações em que a otimalidade pode romper a relação entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Quando isso ocorre as variáveis duais se tornam apenas variáveis de otimização. Essas não condizem mas com o significado matemático (i.e., as condições de otimalidade) atrelados a elas. Quando esse rompimento ocorre, o mesmo é chamado como perda de significado matemático.

3.1.3.6.2 Dualidade lagrangeana em LP

Problemas do tipo LP são um caso especial para a teoria da dualidade, uma vez que possuem diversas propriedades que lhe são particulares. Considera-se, sem perda de generalidade, que um LP (primal) pode ser descrito como um FBA:

$$\begin{aligned}
 & \max_{\mathbf{v}} && \mathbf{c}^t \mathbf{v} \\
 & \text{s. t.} && \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
 & && \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & && \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
 \end{aligned} \tag{23}$$

Pela definição de problema dual, o dual do primal acima (FBA) é representado pela Equação 24:

$$\begin{aligned}
 & \max_{\lambda, \mu_1, \mu_2} && -\mathbf{c}^t \mathbf{k} + \begin{bmatrix} \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \mathbf{S} \cdot \mathbf{k} \\ \mathbf{LB} - \mathbf{k} \\ \mathbf{k} - \mathbf{UB} \end{bmatrix} \\
 & \text{s. t.} && -\mathbf{c} + \mathbf{S}^t \lambda - \mu_1 + \mu_2 = \mathbf{0} \\
 & && \mu_1, \mu_2 \geq \mathbf{0} \\
 & && \lambda \in \mathbb{R}^m \\
 & && \mu_1, \mu_2 \in \mathbb{R}^n
 \end{aligned} \tag{24}$$

Em que $\mathbf{k} \in \mathbb{R}^n$ não é uma variável de otimização, e sim uma constante. O uso dessa constante é presumido original, pois não foi encontrado em outros livros-texto e/ou artigos. A dedução matemática desse resultado, bem como de diversos outros referentes a dualidade, encontra-se no Anexo B – Dualidade em LP. Em biologia de sistemas é comum considerar $\mathbf{k} = \mathbf{0}$.

A função objetivo dual já foi pauta de discussão acerca da validade de algoritmos CSOM (DENEGRÉ, 2011; XU *et al.*, 2013), sendo de suma importância definir toda a família de funções objetivo duais possível.

A dualidade forte, diferente de outros casos de programação matemática, não depende da Slater CQ para ser válida. A única condição que necessita ser obedecida é a viabilidade, tanto dual quanto primal. Em suma, ou o *gap* (distância entre a função objetivo primal e dual em um ponto ótimo) é inexistente ou tende ao infinito, nesse último caso, um dos problemas é inviável.

A fim de ilustrar a independência da Slater CQ para a dualidade forte, considera-se um LP qualificado por LICQ, que possui solução ótima finita. O seu problema dual, por consequência, possui conjunto de variáveis duais único. Dessa forma, é notável que, considerando a *DF*, o problema dual não é qualificado pela Slater CQ, muito embora a dualidade forte seja válida.

Outra característica relevante da dualidade em problemas lineares, é que o dual e o primal são totalmente independentes, ambos são problemas LP que não possuem variáveis de otimização de seu par. Isso significa que as variáveis primais (v) pertencem somente ao problema primal, enquanto as variáveis duais (λ, μ_1, μ_2) pertencem somente ao problema dual. Note-se que é possível aplicar qualificação de restrições separadamente, no entanto os resultados são verificados em ambos os lados primal e dual.

Por exemplo, tal como mencionado na seção 3.1.3.5.1. Problemas de performance, é comum em biologia de sistemas representar uma reação reversível pela diferença de duas reações irreversíveis (uma *forward* e outra *backward*). Nesse caso (assumindo que a matriz estequiométrica não é deficiente, nem pelas linhas e nem pelas colunas), se gera uma deficiência nas colunas. No problema dual, é possível verificar que a DF possui a transposta da matriz estequiométrica (a mesma que agora possui deficiência pelas colunas), que impede que a mesma se qualifique pela MFCQ, fazendo com que o problema primal possua variáveis ilimitadas. Dessa forma, se verifica que a reação *forward* e *backward* são ilimitadas e sua diferença é igual ao valor líquido que seria obtido pela reação irreversível original.

Adicionalmente, tomando o problema dual como primal, e aplicando a dualidade lagrangeana, é possível se obter o problema primal novamente. Em outras palavras, o dual do dual é o primal novamente (dedução apresentada no Anexo B).

3.1.3.7 MPCC

No contexto de biologia de sistemas, existem aplicações que demandam programação matemática em dois níveis, isto é, uma das restrições do problema é um problema de otimização. Esse tipo de problema surge naturalmente nesse contexto: dado um FBA, qual o fluxo metabólico que uma reação desejada pode assumir? (i.e., considerando que o microrganismo foque na produção de biomassa, quanto carbono pode ser redirecionado para os produtos?) Considera-se a formulação da Equação 25 como um BLPP (bilevel) em biologia de sistemas:

$$\begin{aligned}
\max_{\mathbf{v}} \quad & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
\text{s. t.} \quad & \max_{\mathbf{v}} \quad \mathbf{c}^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
& \text{s. t.} \quad \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
& \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
& \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
\end{aligned} \tag{25}$$

Normalmente, problemas de dois níveis, como no exemplo supracitado, podem ser resolvidos sequencialmente, isto é: se realiza um FBA, e o resultado vira restrição do segundo problema. Haja vista que o resultado do FBA é sempre o mesmo, não existe prejuízo em realizar tal abordagem (chamado, no presente manuscrito, como caso sequencial):

$$\begin{aligned}
\max_{\mathbf{v}} \quad & v_{bio} = \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} \\
\text{s. t.} \quad & \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
& \mathbf{c}^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
& \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
& \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
\end{aligned} \tag{26}$$

Em algoritmos CSOM é comum que o problema interno venha acompanhado de variáveis de escolha, nesse caso, binárias. Isso significa que o algoritmo deve escolher entre algumas opções, e essas incidem diretamente no problema de otimização interno. Desse modo, não é possível sequenciar a abordagem sem um “custo”, nesse caso, a função objetivo do problema interno:

$$\begin{aligned}
\max_{\mathbf{y}, \mathbf{v}} \quad & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
\text{s. t.} \quad & \max_{\mathbf{v}} \quad \mathbf{c}_1^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
& \text{s. t.} \quad \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
& y_i \mathbf{LB}_i \leq v_i \leq y_i \mathbf{UB}_i \quad i \in I \\
& \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \\
& |\mathbf{y}|_1 = n - K \\
& \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
\end{aligned} \tag{27}$$

Em que K é um escalar que delimita quantas deleções podem ser realizadas a fim de redirecionar substrato da formação de biomassa ($\mathbf{c}_1^t \mathbf{v} = v_{bio}$) para o produto ($\mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj}$). O “custo” supracitado é o acoplamento entre velocidade de formação de biomassa e fluxo de formação de produto. O acoplamento é de suma importância para esse tipo de modelagem, uma vez que o mesmo garante que os alvos de deleção sejam os mais estratégicos possíveis.

O acoplamento, como realizado no caso sequencial, poderia ser fixado, ou exigir valor mínimo (i.e., $v_{bio} \geq v_{bio \text{ mínimo}}$) como restrição. Nesses casos, o problema se torna um caso linear. Ocorre que, dessa forma, o acoplamento é perdido. Por conseguinte, o algoritmo se torna incapaz de visar alvos de deleção que procurem redirecionar carbono da biomassa para o produto, e sim usar o carbono remanescente.

A Equação 27 é análoga à estrutura usada para conceber o OptKnock (e, por conseguinte, grande parte dos algoritmos CSOM). A ser esclarecido na seção 3.1.5.1., trata-se de um algoritmo que procura maximizar a função objetivo externa ($\mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj}$), sujeita a um problema de otimização interno (FBA), que permite deletar reações ($y_i LB_i \leq v_i \leq y_i UB_i$), por meio de variáveis binárias (\mathbf{y}), para atingir esse fim.

Difícilmente *solvers* são capazes de lidar com problemas de dois níveis, principalmente com variáveis binárias. Desse modo, uma forma de abordar esse tipo de problema, é tentar simplificá-lo em um problema de um único nível. Nesses casos se reforçam as Condições KKT do problema interno.

Para qualquer tipo de problema, as Condições KKT implicam a *CS*, que, por sua vez, gera um termo bilinear não-convexo (C. 4 – C. 5 da Equação 28). A *CS*, como o próprio nome diz, possui a chamada complementariedade (i.e., nesse caso, quando $LB_i - v_i < 0$, é possível que a variável dual associada, μ_{1_i} , seja maior ou igual a zero, e vice-versa). Essa entra como restrição nesse novo problema (tomando como exemplo o BLPP da Equação 25):

$$\begin{array}{llll}
 \max & & & \\
 \mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{bio} & & \\
 \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 & & & \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} & \text{C. 1} & \\
 & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} & \text{C. 2} & \\
 & \mathbf{c} - \mathbf{S}^t \boldsymbol{\lambda} + \boldsymbol{\mu}_1 - \boldsymbol{\mu}_2 = \mathbf{0} & \text{C. 3} & \\
 & (v_i - LB_i) \mu_{1_i} = 0 & i \in I & \text{C. 4} \\
 & (UB_i - v_i) \mu_{2_i} = 0 & i \in I & \text{C. 5} \\
 & \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 \geq \mathbf{0} & \text{C. 6 – C. 7} & \\
 & \boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^m & & \\
 & \mathbf{v}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 \in \mathbb{R}^n & &
 \end{array} \tag{28}$$

Observa-se que, na Equação 28, residem todas as condições de otimalidade do problema interno (FBA da Equação 25): (*i – Primal Feasibility*) as restrições C. 1 e C. 2 indicam as restrições de igualdade e desigualdade (respectivamente) do problema interno. (*ii – Dual Feasibility*) A restrição C. 3 apresenta a viabilidade dual. (*iii – Complementarity Slackness*) As restrições de C. 4 a C. 7 apresentam a *CS*.

As restrições C. 4 e C. 5, como mencionado, possuem comportamento complementar, problemas que possuem restrições desse tipo recebem um nome especial: *Mathematical Problems with Complementarity Constraints* (MPCC).

Esse tipo de problema, quando originado de um BLPP (como é o caso), viola, em todos os pontos viáveis, a MFCQ (não demonstrado, porém deduzido por YE e ZHU, 1995). Como consequência, também viola a LICQ (BIEGLER, 2010). Dessa forma, as variáveis duais são

não únicas e ilimitadas. Esse tipo de problema é consideravelmente desafiador (por possuir restrições não convexas), as violações supracitadas se tornam agravantes. Existe uma extensa literatura sobre MPCC e diversas abordagens para tal, bem como em biologia de sistemas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2023). Porém, para o caso linear, existem alternativas para que o problema volte a ser um LP.

Não obstante, esse tipo de metodologia, de um BLPP para um MPCC, possui condições que devem ser verificadas para que o resultado de o MPCC de fato seja o mesmo que seria obtido em um BLPP. Apesar da dedução parecer isenta desse tipo de questionamento, DEMPE e DUTTA, 2012 questionam se um BLPP é um caso especial de MPCC. A resposta imediata é “não”, um BLPP não é um caso especial de MPCC.

O estudo mencionado possui diversos exemplos em que o máximo global de um MPCC não condiz com o BLPP. Os autores não avaliaram o caso particular de um BLPP cujos níveis são lineares, no entanto sob a Slater CQ no ponto ótimo do problema interno (considerando a convexidade), foi possível afirmar que ambas as soluções globais são iguais. Como mencionado nos Anexos A e B, a Slater CQ pode ser satisfeita em LP, porém, se a mesma não for verificada, a dualidade forte ainda é válida. O questionamento é, se o problema BLPP for um LP-LP (LP no nível externo e LP no nível interno, como é o caso), a Slater CQ é necessária? Se não, existem condições em que o BLPP e o MPCC possuem correspondência (i.e., mesmo valor de ótimo global)? Em biologia de sistemas, é comum que o MPCC e o BLPP percam correspondência? Perguntas como essas são objeto de estudo do presente manuscrito.

3.1.3.7.1 Caso especial: LP

Um MPCC, como mencionado, possui um termo problemático em sua formulação, as restrições originadas da *CS*. No entanto, nesse caso em particular, é possível (como apresentado no Anexo B) verificar que uma condição mais branda de *CS*, *DF* e da dualidade forte são linearmente dependentes, substituindo assim o termo problemático. Essa abordagem foi sugerida, pela primeira vez, por AUDET *et al.*, 1997 e, em biologia de sistemas, na implementação do OptKnock (BURGARD *et al.*, 2003). Os detalhes de dedução são apresentados no Anexo C – MPCC em CSOM. No presente manuscrito, esse tipo de abordagem é referido como MPCC linearizado.

Como mencionado na seção anterior, a formulação de um MPCC a partir de um BLPP possui falhas intrínsecas de otimalidade do problema interno. A abordagem sugerida por AUDET *et al.*, 1997 e BURGARD *et al.*, 2003 procura retornar do MPCC (nesse caso, não-convexo e não-linear) para um problema puramente LP (sem a restrição de complementariedade). Os custos associados a isso são dois: (i) aumento de variáveis em quantidade igual ao número de restrições. Em biologia de sistemas, comumente, um problema em escala genômica possui m restrições de igualdade (em que m é o número de metabólitos) e $2n$ restrições de desigualdade (em que n é o número de reações). Esse primeiro custo é intrínseco à abordagem canônica (de reforçar as Condições KKT do problema interno em um único problema). Também existe um aumento de restrições igual a $n + 1$, referente à DF e à dualidade forte. Nesse último caso, uma única equação (linear), a dualidade forte, substitui $2n$ equações (não-linear e não-convexa) da CS (sendo a principal vantagem da abordagem de AUDET *et al.*, 1997 e BURGARD *et al.*, 2003). Observa-se que esse passo somente é possível pois se trata de um problema interno linear. (ii) A substituição de CS pela dualidade forte assume uma condição mais branda da CS (i.e., troca de uma multiplicação elemento a elemento, por uma multiplicação vetorial). Existe a possibilidade de o problema convergir para uma resposta que não satisfaça a CS do problema interno (muito embora satisfaça a CS mais branda). Nesse caso existe uma cisão entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, em que as variáveis se tornam apenas variáveis de otimização, e perdem o significado matemático.

Em biologia de sistemas, o caso BLPP LP-LP é essencialmente único: (i – CQ) as qualificações, que, em geral, a literatura de MPCC usam como alicerce (principalmente a MFCQ, como mencionado em diversos teoremas em BARD, 2013). Isso se deve pela natureza do metabolismo, e por conseguinte, da matriz estequiométrica, possuindo dependência linear para as reações e metabólitos. (ii – Linearidade) Em MPCC é comum que se assuma que o problema interno não é linear, no entanto, em biologia de sistemas, a maioria dos problemas é abordado por programação linear. Nesse tipo de problema, como apresentado nos Anexos B e C, é possível eliminar a necessidade de se utilizar um MPCC substituindo as restrições de complementariedade fazendo uso da teoria da dualidade. Qualquer outro problema, que não seja um LP, torna essa abordagem impossível.

Enquanto a primeira característica torna o problema substancialmente mais complexo, a segunda concebe um tipo de problema novo que não foi encontrado, na literatura, uma categoria, ou descrição matemática, para tal. Esse caso especial é explorado no presente trabalho, sob a óptica da biologia de sistemas, visando descrever condições, quando possível, para preservar o significado matemático das variáveis duais.

3.1.3.8 Bilinearidades em programação inteira mista

Modelos em CSOM procuram não somente obter compreensão do metabolismo, como também o modificar para atingir os melhores valores possíveis de função objetivo. Enquanto o primeiro pode ser respondido pelo BLPP da Equação 25 (assim como o LP da Equação 26), o segundo somente pode ser respondido alterando a topologia do problema, apresentado pelo BLPP da Equação 27 (i.e., o primeiro é um observador do metabolismo, enquanto o segundo de fato toma decisões por meio de variáveis binárias).

Realizando a mesma estratégia proposta por AUDET *et al.*, 1997 e BURGARD *et al.*, 2003, é possível verificar a existência de um termo bilinear na dualidade forte. A literatura possui três abordagens (em biologia de sistemas) capazes de lidar com esse problema: (*i* – OptKnock) interpretar, a priori da resolução do problema, quais reações estão em seus limites reacionais (**LB** e **UB**) e assim concluir, pela *CS*, quais variáveis duais associadas são zero ou não (BURGARD *et al.*, 2003). (*ii* – RobustKnock) Inserir variáveis e restrições novas no MPCC, de forma que o termo bilinear possa ser captado por uma variável contínua, eliminando assim o problema (TEPPER e SHLOMI, 2010). (*iii* – ReacKnock) Inserir restrições redundantes no problema interno do BLPP, sendo possível fazer uso da redundância das variáveis duais associadas, e assim anular o termo bilinear em qualquer cenário (XU *et al.*, 2013).

A primeira abordagem (OptKnock) *in silico* apresenta algumas falhas teóricas e, possivelmente, são herdadas nos resultados dos experimentos (como apresentado no estudo de XU *et al.*, 2013). A última (ReacKnock) se mostra a mais eficiente pelo número reduzido de novas inserções, bem como na, aparente, ausência de deficiências. Maiores detalhes sobre as bilinearidades geradas podem ser encontrados no Anexo D – Bilinearidades em CSOM.

3.1.4 Algoritmos CSOM

Os CSOM simulam o comportamento de uma única célula como parte do processo de (tentar) responder a uma pergunta de interesse. Alguns exemplos dessas são: (*i*) Qual o rendimento ótimo máximo ou mínimo de uma reação após a maximização de biomassa? (*ii*)

Como esse microrganismo responde caso uma reação seja deletada? (iii) Como esse microrganismo responde caso um gene seja mais ou menos expresso (entendido aqui como regulação)? (iv) Se uma dada reação (ou reações) heterólogas fossem adicionadas, como o microrganismo se comportaria? (v) Se um cofator fosse substituído por outro, a reação de interesse atingiria um máximo teórico maior? De forma sucinta, os CSOM tentam propor o melhor organismo possível para um fim, ainda que esse mutante nunca tenha sido concebido na vida real. O presente manuscrito aborda os dois primeiros questionamentos.

Apesar de até agora apenas CSOM solucionados por programação matemática tenham sido apresentados, existem algoritmos que propõe uma estratégia heurística. A principal diferença entre eles é a “qualificação da solução” (diferente de qualificação das restrições). O primeiro, estratégias determinísticas, dadas as Condições KKT e a natureza do problema, garante uma solução ótima global, como mencionado, geralmente fraca e não única. O segundo, estratégias heurísticas, garante uma solução, porém não é possível afirmar se é ou não ótima local, muito menos global. A principal moeda de troca entre eles é o custo computacional. Enquanto CSOM por programação matemática são mal escalonáveis, mais lentos e muito custosos, os algoritmos meta-heurísticos sempre encontram solução, embora não garantam otimalidade.

Existe uma sugestão de taxonomia inicial no trabalho de MAIA *et al.*, 2016, muito embora o interesse no presente manuscrito seja apenas por programação matemática. Dentro desse nicho, existem algoritmos que procuram sugerir a melhor cepa por meio de regulações e deleções (e.g., OptReg, PHARKYA e MARANAS, 2006 e EMILiO, YANG *et al.*, 2011), que não são explorados no presente manuscrito. Enquanto existe um consenso na literatura de CSOM sobre o que é uma deleção, não existe consenso sobre como se representa “regulação”.

A argumentação para a escolha de uma solução ótima global, independentemente de seu custo, é justificada pelo trabalho experimental. A construção de cepas recombinantes é conhecida por ser onerosa, mesmo com técnicas em seu estado-da-arte. Produzir esse tipo de trabalho, que demanda mão-de-obra especializada, reagentes com custo substancial, testes a posteriori da transformação e tempo justifica um maior tempo computacional para se obter a melhor sugestão possível de mutante.

É válido ressaltar que, na prática, algoritmos do tipo OptKnock, quando solucionados por algoritmos determinísticos, podem levar desde dias até anos (valor estimado). O tempo aumenta substancialmente dependendo da quantidade de reações, número de deleções e o alvo desejado.

É comum que os algoritmos CSOM, de modo geral, sejam propostos, avaliados em um estudo de caso *in silico*, porém raramente são estudados em casos empíricos. Nesses casos raros, existem exemplos bem-sucedidos no caso do primeiro algoritmo resolvido por programação matemática, OptKnock: (i) Aumento da produção de lactato de 25% a 73% em *E. coli* iJR904 (FONG *et al.*, 2005). (ii) Aumento da produção de 1,4-butanodiol em mais de 300% em *E. coli* iJR904 (YIM *et al.*, 2011). Mesmo sendo um tema recente, existem patentes de microrganismos obtidas graças aos algoritmos CSOM. Considerando ainda o *OptKnock*, é possível verificar que o mesmo foi usado para maximizar a produção de: (i) ácido adípico (U.S. 7,799,545 B2), (ii) 1,4-butanodiol, 4-hidroxibutanal e 4-hidroxiburitil-CoA (U.S. 20,110,229,946 A1), (iii) álcoois primários (U.S. 7,977,084 B2) e (iv) 1,4-ciclohexanodimetanol (U.S. 20,120,156,740 A1).

Apesar dos resultados contundentes obtidos graças ao OptKnock, não existem garantias de que o resultado será observável empiricamente. Isso é, mesmo que as estimativas levem a, por exemplo, dois terços do rendimento teórico, é possível que esse valor jamais seja atingido. Isso se deve pelo máximo teórico ser o máximo valor fisicamente possível, condição que pode ser muito distante da realidade biológica.

De modo geral, todos os algoritmos similares ao OptKnock, possuem o mesmo objetivo e as mesmas ferramentas: realizar deleções (i.e., alterar a topologia do problema) para se maximizar uma função objetivo industrial (i.e., maximização do produto), restrita pela função objetivo biológica (i.e., desejo intrínseco do microrganismo de perpetuar a espécie).

É comum encontrar variações entre os algoritmos da forma com que visam procurar um compromisso do balanço entre tempo computacional e funcionabilidade. Isso vai desde trocar a abordagem clássica (a ser explicada na seção 3.1.5.1) trocando um problema de dois níveis (*bilevel*) por dois problemas de um único nível (*singlelevel*) (AERITH, SHINRAI e KONDO, 2022), até mesmo eliminar a possibilidade de se obter um resultado único (EMILiO, YANG *et al.*, 2011). Essa “zona cinza”, que não abandona a programação matemática, mas ao mesmo tempo procura mitigar os pontos fracos (alto tempo computacional), é o principal ponto explorado pelos algoritmos.

Como resultado final espera-se sugestões para se obter um dado mutante (e.g., deleção em genes ou reações, ou ainda propostas de regulações e seus valores quantitativos), o fluxo teórico do mesmo (e.g., máximo fluxo reacional teórico da formação biomassa e do produto desejado) e a distribuição dos fluxos internos (que é não única devido ao máximo global ser, geralmente, degenerado).

Algoritmos CSOM podem agir em qualquer nível hierárquico, isto é, em nível genético, enzimático e/ou reacional. Observa-se, no entanto, que a fluxômica leva em consideração

somente o nível reacional. Dado que uma das ambições de CSOM é sugerir mutantes para um dado fim industrial, note-se que manipulações *in vivo*, nesse nível, são, geralmente, mais desafiadoras que a nível genético. A complexidade dessas associações entre Gene-Proteína-Reação (*Gene-Protein-Reaction*, GPR ou *Gene-Protein-Reaction Associations*, GPRA) geralmente, não são consideradas. O Apêndice A – Restrições a topologia em CSOM e GPR, apresenta uma revisão sobre GPR.

3.1.5 Algoritmos CSOM-MP-K

São chamados, somente nesse manuscrito, de CSOM-MP-K, algoritmos no contexto de CSOM, solucionados por programação matemática (*Mathematical Programming*, MP), que permitem apenas deleções (*Knockouts*, K).

Os algoritmos CSOM variam na forma de abordar e de qual problema procuram solucionar. No entanto, a ideia central, é trabalhar as restrições dos problemas de forma a examinar uma região convexa específica do espaço nulo. Em outras palavras, é comum se fixar uma condição (geralmente maximização da formação de biomassa), e, com essa restrição, examinar alterações, sem ou com penalidade, para maximizar um produto (e.g., para garantir a viabilidade, considerar que o microrganismo atinja, no mínimo, 10% da velocidade de formação de biomassa).

Esse tipo de problema, na prática, redireciona o fluxo reacional de um local do metabolismo para outro, nesse caso, da formação de biomassa para a formação de produto. O *OptKnock*, por exemplo, com uma redução de 18% na formação de biomassa, obteve um aumento de mais de 8.816% na formação de succinato para *E. coli* (fluxo máximo teórico) (BUGARD *et al.*, 2003).

Para que isso seja possível, é obrigatório que exista um acoplamento entre formação de biomassa e a formação de produto, do contrário o espaço a ser examinado deve ser outro que não o sugerido nos algoritmos (i.e., não existe fluxo reacional que, se perturbado, incremente a função objetivo). Por acoplamento, entende-se que, ao se produzir biomassa, também se produz um dado produto. Matematicamente, um dado fluxo metabólico de uma reação que pertence ao perfil de fluxos internos da formação de biomassa deve pertencer também ao conjunto do perfil de fluxos internos da formação de produto. Um estudo de VON KAMP e KLANT, 2017,

demonstrou que quase sempre existe esse acoplamento. Sendo assim, se torna razoável assumir tal hipótese, salvo se existir evidências empíricas ou teóricas.

O redirecionamento do fluxo reacional de carbono pode ser feito de diversas formas: (i) deletando reações, (ii) aumentando ou reduzindo seus limites reacionais (i.e., regulação positiva e negativa), (iii) inserção de reações heterólogas, (iv) alterando coenzimas. Essas abordagens, ou combinações delas, podem ser encontradas em algoritmos CSOM. Note-se que nos dois primeiros casos (i e ii) não ocorre mudança no espaço nulo da matriz estequiométrica, somente nos limites reacionais. Para o terceiro (iii) ocorrem mudanças no espaço nulo da matriz estequiométrica. Somente o primeiro (i) é abordado no presente manuscrito.

Adicionalmente, a forma como essas alterações são implementadas (e.g., por um BLPP com variáveis binárias, similar ao apresentado na Equação 27, ou ainda por considerar uma abordagem sequencial, como o AERITH) afetam o resultado. Essas ditam como os subconjuntos do espaço nulo da matriz estequiométrica são restritos e como os mesmos são investigados, assim como quais alvos de modificações são escolhidos. Dado que a maioria dos algoritmos não são testados empiricamente, existem sugestões na literatura para comparações, no entanto são escassas e arbitrárias (algoritmos de pós-processamento).

Análises de pós-processamento, geralmente, se resumem a verificar as consequências biológicas geradas pelo conjunto de modificações e estudar o perfil dos fluxos internos. Apesar dos últimos serem não únicos, os estudos na área não estudam a fundo como esses podem variar e o quão plausível são esses limites.

Nessa subseção são apresentados, em ordem cronológica, algoritmos considerando apenas deleções. Quando essas ocorrem, somente o fluxo deletado é fixado em zero, logo, não existe eliminação da variável.

A Tabela 1 resume cada algoritmo da presente seção:

Tabela 1 – Resumo dos CSOM-MP-K

Algoritmo	Tipo de problema	Bilinearidade	GEM	Ref.
OptKnock (Reformulado)	MILP de dois níveis	Tipo I	<i>E. coli</i> <i>iAF1260</i>	CHOWDHURY <i>et al.</i> , 2015
RobustKnock	MILP de dois níveis	Tipo II	<i>E. coli</i> <i>JR904</i>	TEPPER e SHLOMI, 2010
ReacKnock	MILP de três níveis	Tipo III	<i>E. coli</i> <i>iAF1260</i>	XU <i>et al.</i> , 2013

Algoritmo	Tipo de problema	Bilinearidade	GEM	Ref.
OptGeneKnock	MILP de dois níveis	Tipo III	<i>E. coli</i> <i>iAF1260</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2015
egKnock	MILP de dois níveis e sequencial	Tipo III	<i>E. coli</i> <i>iAF1260</i>	XU, 2019
gcOpt	MILP de dois níveis e sequencial	Não informado	<i>E. coli</i> <i>J01366</i>	ALTER e EBERT, 2019
AERITH	Sequencial	N/A	<i>E. coli</i> <i>J01366</i> (atualizado)	SHINRAI e KONDO, 2022

Em que o Tipo I está para abordagens similares ao OptKnock (conotado aqui como abordagem clássica). Tipo II está para a substituição de variável. Tipo III está para exploração de cada cenário possível em conjunto com restrições redundantes. Note-se que Tipo I, II e III fazem alusão aos índices *i*, *ii* e *iii* do Anexo D (para bilinearidades).

É válido ressaltar que os algoritmos citados nessa seção foram todos os encontrados até o final do ano de 2022.

Os algoritmos mais importantes e essenciais para o desenvolvimento das metodologias são apresentados nesta parte do corpo do manuscrito. Enquanto demais algoritmos, revisados, porém não essenciais, são apresentados no Apêndice B – demais CSOM-MP-K.

3.1.5.1 OptKnock (BURGARD *et al.*, 2003)

O OptKnock é o primeiro algoritmo proposto a maximizar um fluxo objetivo somente com deleções. Assume-se um problema de FBA, em que o mesmo restringe a região viável maximizando a biomassa. No nível externo, um MILP, que tem como restrição esse LP, cujas variáveis de otimização não binárias e os fluxos reacionais (contínuos). As variáveis binárias não interagem com os limites de reações do problema interno (funcionando como interruptor), enquanto se deseja maximizar um fluxo objetivo. Matematicamente, se tem o problema da Equação 27:

$$\begin{aligned}
& \max_{\mathbf{y}, \mathbf{v}} \quad \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
& \text{s. t.} \quad \max_{\mathbf{v}} \quad \mathbf{c}_1^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
& \quad \text{s. t.} \quad \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
& \quad \quad y_i LB_i \leq v_i \leq y_i UB_i \quad i \in I \\
& \quad \quad \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \\
& \quad \quad \mathbf{1}^t \mathbf{y} = n - K \\
& \quad \quad \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
\end{aligned} \tag{29}$$

Note-se que o problema interno do OptKnock é um FBA, e a restrição ligada às variáveis binárias ($\mathbf{1}^t \mathbf{y} = n - K$) limitam o número de intervenções, no caso K é um escalar que limita o número máximo de deleções. Note-se ainda que o algoritmo pode deletar reações sem penalidades (i.e., influência negativa no valor da função objetivo). No problema interno existem variáveis do problema externo, as binárias, essas são vistas como parâmetros e não como variáveis para o problema interno.

Caso uma reação i seja deletada, o valor da reação v_i é fixado a zero. Com essa reação deletada, o algoritmo estima o fluxo máximo da formação de biomassa (i.e., FBA, problema interno), que tende a ser diferente, uma vez que é esperada uma perda de carbono de uma região do metabolismo para a de interesse. Dado que o maior fluxo de carbono é destinado para a formação de biomassa (devido ao problema interno), é natural que culmine no desvio de carbono da formação de biomassa para o produto.

Exemplo do funcionamento do algoritmo: uma quantidade arbitrária de glicose (fonte de carbono) entra na célula, suponha que 99% sejam redirecionados para formação de biomassa, e menos de 1% do carbono sobressalente consegue ser direcionado para formação do produto desejado. A(s) deleção(-ões) a serem sugeridas possui(-em) apenas um objetivo: maximizar a função objetivo externa. Dessa forma, o papel do algoritmo é escolher uma deleção que maximize a função objetivo industrial. Como é considerado que o carbono, primeiro, é direcionado para o objetivo biológico (assumido como formação de biomassa pela literatura e nesse manuscrito), ou as deleções diminuem ou não alteram o valor da função objetivo biológica. Na prática, isso significa que o carbono seria redirecionado da formação de biomassa para a formação de produto. Existem ainda subprodutos do metabolismo que podem ser competidores da fonte de carbono (e.g., etanol quando se deseja maximizar hidrogênio). O algoritmo pode optar por cessar a produção de etanol com uma única deleção e manter a produção de biomassa em valores ótimos. No entanto, se qualquer outra deleção apresentar um aumento maior no objetivo industrial, o mesmo será preferido, ainda que diminua a produção de biomassa. O principal objetivo desse exemplo é ilustrar que o problema interno não possui

compromisso nenhum em manter a valor de formação de biomassa ótimo em seu valor máximo teórico (da cepa selvagem) após as deleções.

Observa-se que, com o aumento das deleções (i.e., conforme se define um K cada vez maior) ocorre o comportamento supracitado: o redirecionamento de carbono da formação de biomassa para os produtos. O comportamento padrão do algoritmo não é necessariamente esse, no entanto, a necessidade de obter “reagente” (i.e., substrato) para formação de produto pode conduzir o algoritmo ao redirecionamento supracitado. Apesar da demanda poder ser suprida pela eliminação de subprodutos, uma quantidade maior de carbono, geralmente, pode ser obtida retirando-a do objetivo biológico. Isso acontece pois, matematicamente, todo o carbono possível é destinado para o objetivo biológico.

Sendo assim, é razoável assumir que algoritmos do tipo OptKnock possuem o comportamento de usar o acoplamento para redirecionar carbono da produção de biomassa para a produção de produto.

O citado acoplamento (seções 3.1.3.7 MPCC e na presente) faz referência justamente à possibilidade de se redirecionar carbono da biomassa para os produtos, ao passo que se preserva o objetivo biológico. Se o mesmo não existisse, mesmo com um número grande de deleções (i.e., um K com um valor próximo ao número de reações), não se perceberia aumento da função objetivo industrial.

Em termos de cálculo, considerando 6 deleções ($K = 6$), o algoritmo deve procurar qual é a melhor combinação do vetor \mathbf{y} para tal. Se caso o problema fosse solucionado por força bruta, seriam necessários solucionar $n!/(n - K)!$ LP's. Note-se que a matriz estequiométrica de *E. coli* iAF1260, sem pré-processamento e ou qualquer tipo de rotulação (i.e., reações que ficam de fora do grupo das que podem ser deletadas), possui 2382 reações. Considerando um milésimo de segundo para solucionar um LP, seria necessário um número ordens de grandeza maior que o tempo de existência do universo (~13 bilhões de anos, ADE *et al.*, 2016). Note-se ainda que, conforme o número deleções aumenta, o número de otimizações necessárias (LP's) aumenta exponencialmente. Sendo esse o principal motivo para se limitar o número de deleções pelo parâmetro K . Adicionalmente a forma de solucionar o MILP de dois níveis também influencia diretamente no tempo computacional e no resultado final. O exemplo supracitado ilustra que a abordagem para se solucionar um problema dessa magnitude é muito importante para se obter o resultado em tempo viável. Ilustra ainda um ponto fraco todos os algoritmos da área: má escalonabilidade, ou seja, o esforço computacional cresce exponencialmente com o número de variáveis de otimização (i.e., reações).

O algoritmo usado no OptKnock para se converter o problema em um único nível possui origens em um trabalho anterior pelo mesmo grupo de pesquisa (*ObjFind*, BUGARD e MARANAS, 2003). Não somente esse trabalho, mas muitos outros também fazem uso dessa mesma abordagem. Brevemente, se procura explorar o espaço das soluções alternativas geradas pelo FBA, consequência do mesmo explicada em 3.1.3.4. Unicidade. Porém, sem resolver o FBA repetidas vezes, uma vez que a descrição matemática depende diretamente do resultado do LP (i.e., representar o AS_{Primal} como equações algébricas lineares sem a necessidade de resolver o LP correspondente). Para tanto, pode-se considerar a dualidade forte, dessa forma a solução ótima do primal (FBA) é substituída pelas variáveis de otimização do problema dual. No entanto, o problema dual possui restrições, que são incorporadas na nova descrição matemática desse novo espaço, em que as variáveis de otimização são primais e duais simultaneamente. Não obstante, os autores sugeriram um FVA para as variáveis duais, em outras palavras, uma técnica de pré-processamento, porém no problema dual. Note-se que ao fim desse algoritmo o problema interno foi convertido em um conjunto de equações algébricas que delimita uma região viável em um espaço maior (i.e., maior número de variáveis) que o original (metodologia explicada com maiores detalhes no Anexo C).

Supostamente esse algoritmo consegue descrever matematicamente o espaço de soluções alternativas do FBA. Porém, tanto no estudo original, quanto no próprio OptKnock, a validade, propriedades ou qualquer estudo sobre essa descrição não foram sugeridos ou realizados. Supondo que a descrição funcione como idealizada (i.e., seja possível descrever um LP em um conjunto de equações algébricas), então o problema, de um MILP de dois níveis, é substituído por um de um único nível (cuja função objetivo é a do problema externo). Dessa forma é possível implementar o modelo resultante e resolvê-lo por meio de um *solver* comercial (no caso do OptKnock, CPLEX 7.0 (BIXBY, 2012) na plataforma GAMS (BUSSIECK e MEERAUS, 2004)).

Os autores de outro algoritmo (ReacKnock, XU *et al.*, 2013, DENEGRÉ, 2011) argumentam que os autores do OptKnock erraram em termos de cálculo (e não de concepção). Sendo assim, os autores do ReacKnock sugeriram outra forma de abordar um MILP de dois níveis (AUDET *et al.*, 1997). Entende-se que o ReacKnock (a ser explicado em detalhes na subseção 3.1.5.3.), apresenta o mesmo algoritmo que o OptKnock, porém a forma como a bilinearidade é abordada é diferente (Anexo D). Os autores do ReacKnock argumentam que: (i) o máximo ótimo obtido pelo ReacKnock é maior que o máximo obtido pelo OptKnock. (ii) Em três tempos computacionais máximos distintos (10 min, 1 hora, 2 dias e 8 horas), o OptKnock não atingiu o mesmo resultado que o concorrente, tampouco obteve resultados similares (fluxo

de formação de biomassa, de produto, FVA da produção máxima e as reações a serem deletadas) para a maioria dos compostos em que foi testado. XU *et al.*, 2013 sugerem que isso é devido aos erros na dedução matemática cometidos por BURGARD e MARANAS, 2003. (iii) Para o hidrogênio, o *OptKnock* simplesmente não obteve uma resposta satisfatória (sugeriu nenhuma deleção e um resultado ótimo inviável), enquanto o *ReacKnock* obteve êxito na tarefa. É válido ressaltar que a implementação do *OptKnock*, usada por XU *et al.*, 2013, foi a implementada no *COBRAToolbox* (SCHELLENBERGER *et al.*, 2011), cujo *solver* é o Gurobi 5.0, na plataforma MATLAB (The MathWorks, Natick, MA).

A falta de consenso sobre a validade do algoritmo aplicado ao *OptKnock* para convertê-lo em um MILP de um nível não impediu que diversos autores usassem essa abordagem ao invés da usada por XU *et al.*, 2013.

3.1.5.1.1 *OptKnock* Reformulado (CHOWDHURY *et al.*, 2015)

A resposta a XU *et al.*, 2013 foi apresentada por CHOWDHURY *et al.*, 2015. No estudo, em que consta a reformulação do *OptKnock*, do *OptForce* e uma comparação de ambos, é possível verificar que alguns aspectos apontados por XU *et al.*, 2013 foram corrigidos.

Um dos erros apontados foi a ausência de um termo bilinear gerado por uma variável dual (do problema interno) e a variável binária (do problema externo) (o mesmo termo mencionado no Anexo D). A variável dual é a referente aos limites reacionais, que estão multiplicados, também, pela variável binária na função objetivo do problema dual, dando origem ao termo bilinear na função objetivo do problema dual. É válido ressaltar que todos os algoritmos que fazem uso dessa abordagem, inicialmente proposta por BURGARD e MARANAS, 2003, herdam esse problema.

A complexidade de um problema inteiro misto aumenta consideravelmente quando o mesmo possui não linearidades. CHOWDHURY *et al.*, 2015 argumenta que, no caso de deleção, as restrições viram restrições de igualdade (i.e., fluxo da reação é fixado em zero), e para o caso em que a deleção não ocorre, considerando a complementariedade (CS), é possível eliminar a variável dual e tornar o problema linear. Sendo assim, na prática, o termo bilinear é eliminado, tornando-se um MILP. Adicionalmente, foi sugerida uma etapa de pré-processamento para remoção de reações bloqueadas (e.g., algoritmo fazendo uso de FVA).

Segundo os autores, para o caso em que a deleção não ocorre (ainda é possível se obter um termo não linear), os limites reacionais são arbitrariamente grandes e nunca são atingidos (discutido com mais detalhes no Anexo D). Quando existem restrições com respeito a fluxos reacionais limitantes, tal qual para: reações irreversíveis, assimilação de substrato, fluxo reacional referente a adenosina trifosfato (ATP) de manutenção e formação de biomassa, se considerou o fluxo limite inferior.

Ainda que seja possível apresentar ressalvas sobre o problema (como apresentado no Anexo D), e que seja discutível sua validade, isso não impediu que o mesmo fosse aplicado *in silico*. Foram obtidos ainda mutantes *in vivo* que apresentaram resultados satisfatórios. É válido ressaltar que a reformulação proposta é uma correção da metodologia aplicada no primeiro artigo, em que a ideia por trás do algoritmo continua sendo a mesma.

O *solver* usado para solucionar esse problema foi o CPLEX, através do ambiente GAMS. Em termos de performance, os autores concluem que o tempo computacional para se solucionar o OptKnock cresce potencialmente com relação ao número de intervenções (resultado esperado). Nesse caso, da ordem do cubo do número de intervenções.

3.1.5.2 RobustKnock (TEPPER e SHLOMI, 2010)

O OptKnock, e outros algoritmos CSOM, geralmente visam entregar o melhor resultado possível para um dado fluxo objetivo. Em outras palavras, isso significa que o resultado final é o fluxo máximo teórico. No entanto, na prática, esse máximo é utópico. Não considerado no modelo, existe um custo para processos moleculares (e.g., transcrição, tradução, transformações pós-traducionais), bem como para manutenção celular e processos fisiológicos diversos. Cada um desses “gastos” constituem carbono não direcionado para produção de produto, e conseqüentemente, o fluxo máximo teórico pode se tornar muito otimista.

Como mencionado, algoritmos CSOM não fornecem garantias de que o microrganismo de fato realizará a função objetivo implementada no modelo final. Adicionalmente, supondo que o mesmo se comporte da forma idealizada, ainda existem gastos intrínsecos à fisiologia celular e à manutenção da viabilidade. Em todos os casos, estimar o gasto de carbono para tal é de difícil estimação. Sendo assim, o RobustKnock procura encontrar um fluxo para que, caso testado empiricamente, o microrganismo consiga atingir, no mínimo, o fluxo estimado. Apesar dos autores argumentarem que o resultado obtido pelo algoritmo seja o mínimo garantido, o

mesmo ainda opera sob hipóteses otimistas (e.g., gasto de carbono para sintetização de enzimas, transporte ativo e regulação), sendo assim razoável assumir que o resultado obtido pode não ser experimentado em cultivos empíricos.

A estrutura do algoritmo é similar ao do OptKnock (Equação 27), porém existe um problema max-min, ao invés de maximização, no problema externo. Dessa forma, procura-se o maior limite mínimo possível para um dado fluxo, permitindo que o algoritmo realize um número limitado de deleções. O problema não é apresentado, matematicamente, nessa subseção, no entanto é válido ressaltar que o leitor deve estar atento ao ler o estudo de referência na íntegra. Existem diversos erros de digitação nas fórmulas apresentadas pelos autores.

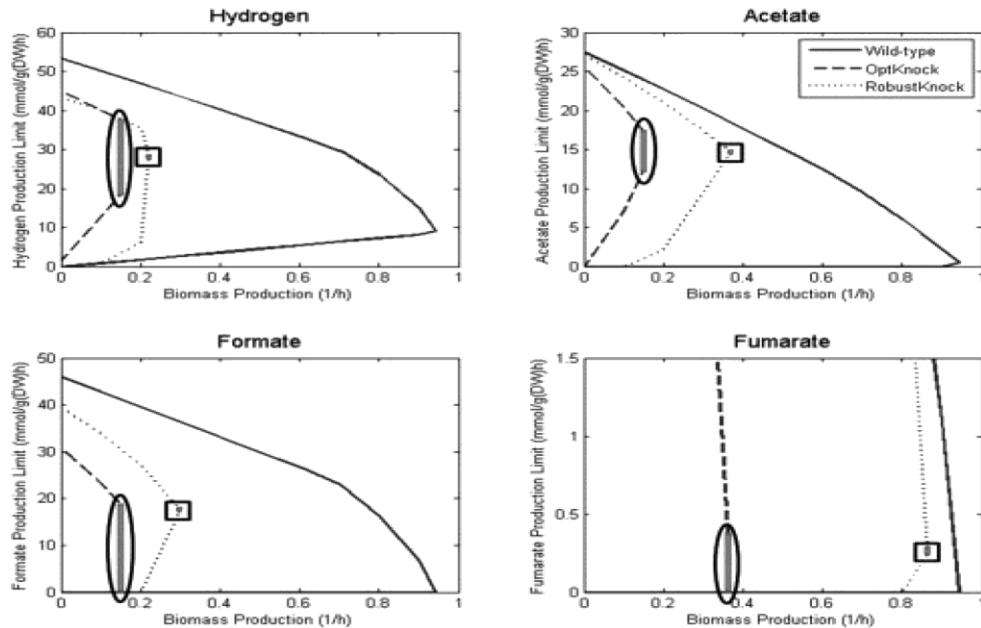
Dado que o problema interno, assim como no OptKnock, é um FBA comum, então a descrição matemática do espaço viável alternativo (do problema interno) é a mesma em ambos os algoritmos. Porém, dado que a função objetivo é outra, existe a possibilidade de a topologia da região viável ser alterada de outra forma (pelas variáveis binárias), sendo assim, é digno de nota que as sugestões de deleção podem ser muito diferentes.

Note-se que o algoritmo usado para converter o MILP de dois níveis em um MILP de um único nível é igual ao OptKnock. No entanto, diferente do algoritmo anterior, o RobustKnock aborda as bilinearidades, geradas pelas variáveis binárias, por inserção de variáveis e restrições novas (índice *ii* do Anexo D). Adicionalmente existe outra dificuldade no presente algoritmo: lidar com o problema max-min na função objetivo externa.

Quanto ao problema externo (max-min), os autores sugerem usar o problema dual, após converter o FBA interno em um conjunto de equações (AUDET *et al.*, 1997 e BURGARD *et al.*, 2003). Dessa forma o problema externo resultante volta ser um problema de maximização. Note-se que as variáveis de otimização da estrutura final do algoritmo são as duais, no entanto é possível obter as variáveis primais por meio da dualidade forte.

Os resultados dos algoritmos CSOM-MP-K, muitas vezes, apresentam a delimitação de um espaço considerando somente ambos os fluxos objetivos: formação de biomassa e produto. Nesse espaço é notório que fique explícita a relação entre ambos os fluxos. Não obstante, dado que um LP pode delimitar um subconjunto da região viável, não surpreende que ainda seja possível delimitar um outro subconjunto, ainda mais restrito. Dessa forma, é possível verificar que, para o mesmo fluxo de formação de biomassa, exista um horizonte viável para o fluxo de produção do produto.

Figura 3 - Comparação do *OptKnock* e *RobustKnock*



Fonte: TEPPER e SHLOMI, 2010

A Figura 3 apresenta uma comparação entre os algoritmos *OptKnock* e *RobustKnock*. Considera-se a topologia dos dois fluxos objetivos: produto (hidrogênio, acetato, formiato e fumarato respectivamente) e a biomassa. É possível verificar uma ilustração do supracitado: em todos os casos obtidos pelo *OptKnock* é possível visualizar um horizonte de possibilidades de fluxos de produção de produto. Em outras palavras, para o fluxo de biomassa ótimo, existe um intervalo possível para o fluxo de produção do produto (espaço de soluções alternativas resultante). Essa região é justamente onde o *RobustKnock* atua: como a formulação do problema externo é maximizar o mínimo do fluxo de produção do produto, é notório que o limite inferior das soluções alternativas resultante seja o maior possível. Em alguns casos o máximo obtido, para o resultado do *RobustKnock*, é um ponto, que é possível atestar por inspeção visual em alguns casos.

Observa-se que o *OptKnock* que os autores comparam se trata da primeira versão, proposta por BURGARD et al., 2003. Para essa versão, o modelo usado é de *E. coli* MG1655 (EDWARDS e PALSSON, 2000), já para o *RobustKnock*, se trata de uma modelo expandido, *E. coli* iJR904 (REED et al., 2003). Esse último possui 904 genes, 931 reações e 625 metabólitos.

Em outras palavras, o *RobustKnock* é uma variação do *OptKnock*, em que se procura achatando os valores possíveis do fluxo objetivo do problema externo (formação de produto). Note-se que, como a região viável a ser explorada não é a mesma do *OptKnock* (devido à

estratégia de deleções ser diferente), não é incomum que o resultado do RobustKnock não seja igual ao OptKnock (como é possível verificar na Figura 3).

3.1.5.3 ReacKnock (XU et al., 2013)

Já mencionado na subseção 3.1.5.1.1 OptKnock Reformulado (CHOWDHURY et al., 2015), ReacKnock é um algoritmo similar ao OptKnock, porém as estratégias propostas para simplificação do MILP de dois níveis são diferentes.

ReacKnock possui a ambição de maximizar um fluxo objetivo, restrito à maximização da biomassa. Como mencionado em 3.1.5.1. OptKnock (BUGARD et al., 2003), o principal diferencial desse algoritmo é corrigir seu antecessor. No estudo são questionados alguns pontos pelos autores: (i) ausência de termo bilinear na função objetivo (pode ser encontrado no primeiro material suplementar do artigo original), muito embora outros detalhes acerca do dual não tenham sido abordados (como são abordados nos Anexos B, C e D). (ii) A validade do algoritmo proposto, muito embora o algoritmo mencionado pelos autores (AUDET *et al.*, 1997) seja igual ao proposto por BUGARD e MARANAS, 2003 com palavras diferentes (i.e., trocasse o nome “variável dual” por “multiplicador de Lagrange e Kuhn-Tucker”). Logo, apesar de criticar a ausência de uma descrição matemática, os mesmos também não apresentaram uma.

A formulação do problema parte do problema da Equação 27 e considera uma restrição adicional (redundante), em que procura-se, após a aplicação da abordagem proposta por AUDET *et al.*, 1997, eliminar um termo bilinear. Detalhes sobre essa dedução podem ser encontrados no Anexo D.

$$\begin{aligned}
 & \max_{\mathbf{y}, \mathbf{v}} \quad \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
 & \text{s. t.} \quad \max_{\mathbf{v}} \quad \mathbf{c}_1^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
 & \quad \text{s. t.} \quad \mathbf{Sv} \leq \mathbf{0} \\
 & \quad \quad \quad -\mathbf{Sv} \leq \mathbf{0} \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \quad \quad \quad y_i \mathbf{LB}_i \leq v_i \leq y_i \mathbf{UB}_i \quad i \in I \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{1}^t \mathbf{y} = n - K \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
 \end{aligned} \tag{30}$$

Exceto por $\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$, a proposta é similar à apresentada no Anexo D. A principal diferença é que os autores, a fim de seguir rigorosamente AUDET *et al.*, 1997, converteram

$Sv = 0$ em duas restrições de desigualdade. Como mencionado em 3.1.3.5.1 Problemas de performance, isso pode significar em tempos computacionais maiores (algo verificado nos experimentos do presente manuscrito). Adicionalmente, devido a essa separação, existem mais m variáveis e restrições no problema final (não apresentado nesta seção). No entanto o mesmo constitui uma versão isenta de erros e o algoritmo, de fato, faz o que o primeiro falhou em realizar (as bilinearidades, Anexo D). O modelo usado foi o de *E. coli* iAF1260, o algoritmo foi implementado em MATLAB, e o *solver* usado foi o Gurobi 5.0.

Os principais resultados foram apresentados na subseção 3.1.5.1.1 OptKnock Reformulado (CHOWDHURY et al., 2015), no entanto é válido ressaltar que, quando comparado ao OptKnock: (i) todos os fluxos objetivos testados (succinato, etanol, acetato, hidrogênio, formiato, gliconato, D-lactato e fumarato) obtiveram resultados (viáveis) melhores para o ReacKnock. (ii) É válido ressaltar ainda que o presente algoritmo permitiu obter todos os seus resultados com tempo computacional fixado em, no máximo, 10 min.

Note-se que o OptKnock foi incapaz de obter resultados ótimos melhores que o ReacKnock, mesmo com tempo computacional muito superior. Esses dois resultados sugerem que a topologia do MILP de único nível proposta no primeiro foi mal descrita, corroborando assim para a argumentação de que o algoritmo possui erros.

XU et al., 2013 argumentam que análises de pós-processamento não foram sugeridas até aquele estudo, argumentam ainda que, pelo algoritmo deles, “todas as soluções múltiplas” podem ser obtidas por uma abordagem chamada de Cortes de Benders Combinatório (*Combinatorial Bender's cut*) (BALAS e JEROSLOW, 1972). Essa, resumidamente, impede que um dado resultado seja obtido pela variável binária do MILP de único nível, obrigando assim o algoritmo a sugerir deleções (sub)ótimas. Observa-se que essa abordagem verifica somente cenários alternativos, no entanto, dentro do mesmo cenário de um dado conjunto de deleções, existe um universo a ser explorado. Apesar da álgebra não ter sido apresentada com rigor, MILP de vários níveis (inclusive mais do que dois níveis) não necessariamente definem um vetor das variáveis de otimização único. Para fins ilustrativos, o algoritmo de pós-processamento proposto é incapaz de comparar a região viável definida por 2 cenários (ou mais) de deleções suficientes. Considerando duas redes metabólicas sugeridas por ReacKnock, pode ser que na primeira sugestão exista um aumento do fluxo de produção de produto de 300%, enquanto na segunda exista um aumento mais tímido de 290%. É possível que, no segundo caso, a função objetivo do MOMA seja ordens de grandeza inferior em comparação ao primeiro. Nesse caso é esperado que o segundo caso seja mais provável que o primeiro se abordado *in vivo*.

O ReacKnock foi escolhido como base de comparação, haja vista que ele preserva a identidade do OptKnock (primeiro trabalho do nicho e objeto de inspiração para algoritmos similares), aparentemente, isenta de erros.

3.1.5.4 Conclusões preliminares

Existem algumas diferenças entre as abordagens (incluindo as do Apêndice B) propostas pelos algoritmos: (i) MILP de dois níveis, (ii) sequencial e (iii) híbrido. De forma generalista, a segunda e terceira abordagem tendem a explorar uma região menor do espaço viável, quando comparada com a primeira, que possui a vantagem de explorar o mesmo por inteiro. A principal funcionalidade que garante isso é a natureza de um BLPP.

Note-se que uma prática comum das duas últimas é fixar o máximo teórico (da cepa selvagem) da função objetivo biológica. É um detalhe simples, mas maximizar a função objetivo biológica e usar o máximo teórico da cepa selvagem possui uma diferença significativa:

(i) No primeiro caso, o valor numérico pode ser alterado caso ocorra uma deleção em qualquer reação. Sendo assim espera-se que esse máximo teórico (da cepa mutada) seja menor que o máximo teórico obtido por FBA em uma abordagem sequencial (cepa selvagem). Ao permitir diferentes valores (ainda que máximo para cepa mutada) o algoritmo ganha a liberdade de redirecionar o carbono da formação de biomassa para o fluxo objetivo industrial. Obter o resultado ótimo para uma restrição (ao invés de um valor fixo), atribui uma liberdade maior para o algoritmo decidir, de forma ótima, em que o mesmo pode “gastar” recursos (i.e., substrato).

(ii) O custo óbvio dessa qualidade é o esforço computacional, por isso abordagens sequenciais e híbridas se tornam tão atraentes. Percebe-se que nos artigos em que mais ocorreram deleções (se considerado as GPR, se refere aqui a deleções em nível genético) o valor máximo foi de cinco. Percebe-se ainda que 5 deleções constituem um pouco mais do que 0,2% de todas as reações (ou sequer 0,4% dos genes) do modelo de *E. coli* iAF1260.

(iii) No entanto, ao se usar uma abordagem híbrida ou sequencial, se renuncia a investigar parte da região viável. Note-se que essa característica é a vantagem mencionada sobre os algoritmos heurísticos.

Para os CSOM-MP-K, existem dois destaques dignos de nota: (i) minimização da variação do máximo e mínimo teórico, como apresentado pelo RobustKnock. (ii) Adição das GPR. Ademais, os algoritmos, nos últimos 20 anos (desde que OptKnock foi concebido), se concentraram em equilibrar as funcionalidades supracitadas e tempos computacionais mais modestos. Adicionalmente, foram notadas duas ausências também dignas de nota: (i) algoritmos de pós-processamento, principalmente nos casos em que não se explorou toda a região viável. Observa-se que o resultado não foi contestado por parte dos autores, isto é, dado que o resultado é conhecido por ser ótimo fraco e, nos casos heurísticos, possivelmente ótimo local, espera-se mecanismos adicionais para mitigar ou solucionar esse revés. (ii) A verificação empírica é desejável, muito embora não tenha sido realizada por nenhum dos algoritmos revisados (em um mesmo estudo). Essa etapa, da comparação da simulação com os resultados biologicamente factíveis, permanece sendo objeto de estudo com poucos (ou nenhum) resultado.

Por fim, um estudo de TOKUYAMA *et al.*, 2018 leva à tona essa questão. Os autores demonstraram que, por mais que os resultados de FBA (e por conseguinte, dos algoritmos CSOM), sejam essencialmente muito otimistas (por estimarem o máximo fisicamente possível), é possível procurar limitações (não previstos no modelo *in silico*), e obter resultados mais próximos das simulações.

3.1.6 Pós-processamento de CSOM

Foram apresentados diversos algoritmos na seção 3.1.5. Algoritmos CSOM-MP-K e Apêndice B, no entanto, apesar de vários deles possuírem a mesma meta, é notável que os resultados podem ser diferentes. Não cabe somente avaliar qual deles é capaz de atingir o maior fluxo objetivo industrial, haja vista que a cepa mutada *in vivo* pode não atingir o máximo teórico (fisicamente possível). Duvido aos aspectos fundamentais da fisiologia celular não serem considerados não é possível obter o rendimento máximo teórico. Alguns exemplos são: custos associados à tradução e transcrição, perda de atividade biológica de enzimas, reparos celulares, custos de transporte ativo, mecanismos regulatórios e até mesmo a multiplicação celular. Desse modo, mesmo algoritmos que operam sob a condição de maximizar o mínimo da função objetivo industrial (e.g., RobustKnock), não garantem que o pior cenário *in silico* seja o mesmo *in vivo*.

É válido ressaltar que, dependendo do modelo de microrganismo, o resultado de um *solver* pode se sobressair a outro. Não obstante, ao se considerar as GPRA, pode ser que o resultado seja completamente diferente, inclusive entre a escolha de diferentes modelos.

Os algoritmos citados estão inseridos no contexto de biologia de sistemas, cujo objetivo primordial é obter compreensão, sistemática e fundamental, da vida. Logo, é notório que o ideal é que esse seja obtido sem a necessidade de realizar experimentos empíricos (haja vista a impossibilidade de se obter dados de um mutante que se deseja construir, e, portanto, não existe ainda). Sendo assim, se torna uma tarefa relativamente complexa, para o experimentalista, optar por um algoritmo para, justamente, propor o mutante para o fim desejado.

Foram encontrados apenas dois estudos (OptPipe, HARTMANN, 2017 e SCHNEIDER e KLAMT, 2019) que propõem formas para realizar tal atividade. Adicionalmente, ambos, por não possuírem dados empíricos (o que pode ser difícil ou impossível de conseguir, dado que o mutante sugerido pode não ter sido desenvolvido na vida real ainda), acabam usando métricas, algumas vezes, arbitrárias para tal avaliação. A complexidade das perguntas que tentam ser respondidas é considerável: a cepa mutante proposta *in silico* se comportará como desejado, ou muito próximo *in vivo*? Se sim, qual o percentual? Caso o percentual seja alto, será possível atingir esse resultado com alta concentração de substrato? Caso o percentual seja baixo *in vivo*, um resultado alternativo subótimo é interessante? Se sim, qual deve ser escolhido? Qual algoritmo fornece todas essas informações com qualidade? Com a cepa escolhida, o que garante que o microrganismo reverta a mutação em um número pequeno de gerações?

Além de todos esses questionamentos fundamentais, existe uma impossibilidade intransponível: o GEM simplesmente não fornece informações suficientes para responder cada uma das perguntas supracitadas. Sendo assim, a melhor alternativa para tal são análises de pós-processamento de cada algoritmo. Porém é inevitável que sejam arbitrárias ou ainda com embasamento biológico pouco (ou não) observado experimentalmente.

3.1.6.1 Ajuste biológico

Como mencionado na seção 3.1.1.3. MOMA, a função objetivo dos algoritmos se baseia na hipótese de a cepa mutante tender a modificar seu metabolismo para o mais próximo possível da cepa selvagem. Note-se que ambos MOMA e ROOM atingem esse objetivo de diferentes formas.

Resumidamente, o MOMA atinge o objetivo minimizando a distância (não necessariamente a euclidiana) entre a distribuição dos fluxos internos da cepa selvagem e da cepa mutada. Já o ROOM atinge esse objetivo penalizando a soma de cada alteração no perfil de fluxos internos da cepa mutada quando comparado com o perfil da cepa selvagem (de acordo com um parâmetro especificado).

Note-se que, em ambos os casos, é necessário saber o perfil dos fluxos internos de ambas as cepas por FBA. Como mencionado em 3.1.3.4. Unicidade, esse perfil é não único e pode assumir um gama de valores. Usar aquele correspondente a uma solução básica (no caso, o resultado do problema de otimização), não quer dizer que esse resultado seja o obtido (ou ainda o obtido com maior frequência) caso a cepa mutada seja cultivada *in vivo*. Embora possua esses defeitos, é uma das ferramentas que consegue captar uma, possível, nova função objetivo da cepa recombinante: tentar retornar a WT (linhagem selvagem, ou *Wild Type*). O OptPipe usou do MOMA (entre outras métricas) para comparar alguns algoritmos CSOM.

SCHNEIDER e KLAMT, 2019, trabalhando sobre o ranqueamento de algoritmos CSOM, defendem que o uso dessa métrica é pouco desejável devido a possibilidade da cepa mutada reverter mais facilmente a mutação ao longo das gerações. Embora o argumento seja contundente, nenhum estudo empírico foi citado. Em outras palavras, o evento pode ocorrer, mas a quantidade de gerações necessárias não foi mencionada.

3.1.6.2 Métricas arbitrárias

Outras métricas que podem ser consideradas são: (i) fluxo objetivo industrial mínimo, (ii) fluxo objetivo industrial máximo, (iii) número de intervenções, (iv) fluxo objetivo biológico máximo, (v) fluxo objetivo industrial mínimo restrito a fluxo objetivo biológico máximo, (vi) dependência de oxigênio, (vii) quantidade de subprodutos, (viii) número de metabólitos que podem acumular no ambiente intracelular, (ix) viabilidade termodinâmica, (x) intervenções redundantes, (xi) viabilidade final.

As duas primeiras métricas, junto com MOMA e/ou ROOM, constituem o algoritmo OptPipe para ranqueamento de CSOM. O conjunto todo constitui, citado nessa subseção, o estudo conduzido por SCHNEIDER e KLAMT, 2019.

As métricas medem aspectos muito diferentes de cada modelo resultante, por exemplo (iii) número de intervenções é adimensional, porém (iv) fluxo objetivo biológico máximo não.

Mesmo com mesma unidade, o (ii) fluxo objetivo industrial máximo pode possuir um valor muito maior que o (v) fluxo objetivo industrial mínimo restrito a fluxo objetivo biológico máximo.

A abordagem proposta por SCHNEIDER e KLAMT, 2019 é fazer um “subranqueamento” entre os próprios critérios, logo, os mesmos são multiplicados por uma constante capaz de adimensionalizar cada um deles e atribuir um certo peso (definido arbitrariamente). Note-se que essa abordagem pode ter um resultado totalmente diferente de acordo com o vetor escolhido para julgar a importância de cada critério. Note-se ainda que essa forma de abordar o problema não é única, tampouco é possível afirmar que é mais ou menos imparcial.

3.1.6.3 Considerações parciais

Todos os critérios sugeridos na literatura não avaliam o algoritmo em si, isto é, a capacidade do mesmo de fornecer uma cepa mutante, ou uma gama de resultados subótimos satisfatórios. Todas as métricas visam avaliar a cepa em si, sendo assim, na melhor das hipóteses uma dada cepa é escolhida, e não um algoritmo. Note-se que algoritmos como o *EMILiO* podem fornecer mais de 150 sugestões de cepa.

Uma forma de avaliar os algoritmos CSOM é analisar a região viável de ambos os níveis simultaneamente, isto é, o MILP de único nível resultante. É possível investigar o perfil de fluxos internos de cada cepa e verificar o tamanho de cada intervalo para cada fluxo. Dessa forma é possível verificar qual o caso que permite maior variabilidade e qual permite menor variabilidade.

Ademais, mesmo que cada sugestão e propostas da literatura sejam aplicadas com êxito, é improvável que todas as perguntas do início da seção sejam respondidas de forma conclusiva para a condição *in vivo*. Sendo assim, o conhecimento obtido pelo ranqueamento CSOM se torna limitado a experimentos *in silico*, podendo ter apenas um vislumbre de como seria *in vivo*.

Como mencionado, não foram encontrados na literatura algoritmos capazes de avaliar o algoritmo em si (e.g., qual é o melhor para um dado fim: *ReacKnock* ou *OptGeneKnock*?), ou ainda qualidade das soluções. Isto é, foi levantado nos Anexos C e D possíveis erros intrínsecos à formulação do MPCC advindo do BLPP, assim como na simplificação do MPCC em um LP. No entanto, não foram sugeridos algoritmos para tal avaliação.

Os algoritmos de pós-processamento, do presente manuscrito, não visam preencher nenhuma dessas lacunas. No presente caso, almeja-se verificar se a estrutura matemática, inicialmente proposta por AUDET *et al.*, 1997 e BURGARD *et al.*, 2003, respeita as Condições KKT do problema interno. Brevemente, verifica-se se a sugestão de mutante é condizente com a literatura de programação matemática, e, portanto, se o resultado está correto.

4 METODOLOGIA

Foram estudados dois casos principais:

(i – Caso I) O primeiro, com ilustrações gráficas, tem como objetivo interpretar, geometricamente, o conteúdo mencionado na seção 3. Revisão bibliográfica, principalmente o contido nos Anexos A – D. A rede metabólica usada é simples e hipotética, servindo apenas para descrição visual do equacionamento descrito.

Entende-se, nesse ponto do texto, que os Anexos A – D constituem todo o arcabouço algébrico para verificação das Condições KKT no problema interno do BLPP.

(ii – Caso II) O segundo, mais extenso, possui o objetivo de comparar a formulação do ReacKnock (1ª formulação) (interpretado aqui, como um OptKnock funcional) com duas formulações sugeridas. Essa formulação não acrescenta funcionalidades ao algoritmo, procura minimizar os efeitos mencionados na seção 3.1.3.5.1. Problemas de performance (2ª formulação). Nessa nova formulação, foi considerada, também, uma formulação quadrática (3ª formulação). Além da avaliação da performance, foi realizada a sugestão de um algoritmo de pós-processamento, que contém rotinas capazes de avaliar as condições de otimalidade do problema interno (algo, até então, ausente na literatura de biologia de sistemas). Foram avaliadas 9 funções objetivo industriais (as mesmas do artigo original do ReacKnock, XU *et al.*, 2013), nas 3 formulações supracitadas. Neste caso, foi usado um modelo de escala genômica. Cabe ressaltar que o objetivo de todos os algoritmos do Caso II é encontrar a melhor combinação de deleções possível para maximizar uma dada função objetivo industrial.

No Caso II, foram investigados elementos com o objetivo de esclarecer a abordagem de BURGARD *et al.*, 2003. Nesse caso, os experimentos são sugeridos a fim de verificar se, em biologia de sistemas, de fato ocorre a violação da CS apontada no Anexo C.

Todas as análises foram conduzidas em nível reacional, sendo assim, informações de genes foram desprezadas. As deleções também ocorrem em nível reacional, desconsiderando toda a complexidade prática desse tipo de manipulação. Dessa forma foi possível comparar com o artigo desejado, XU *et al.*, 2003.

4.1.1 Especificações técnicas

Todas as simulações foram conduzidas em um computador do tipo *desktop* cujas configurações são: (i) Processador: *AMD Ryzen 5 3600X*, *Clock* básico de 3,8GHz (atingindo entre 4,0 ~ 4,1 GHz). O mesmo possui 6 *cores* e 12 *threads*. (ii) Memória RAM: 32 GB com frequência máxima de 3200 MHz, porém, para fins de estabilidade, foram usados somente 3000 MHz. Para todos os problemas do Caso II, o *solver* usado foi o Gurobi (versão 10.0.01, *Gurobi Optimization, L.. (2023). Gurobi Optimizer Reference Manual*, disponível como arquivo complementar *SF_Gurobi_0.pdf*) através de uma interface (*Application Programming Interface, API*) implementada em MATLAB.

4.1.1.1 Tipos de métodos usados

Para simulações de LP ou *Quadratic Programming* (QP), foram usados algoritmos Simplex (primal e/ou dual) ou Barrier (algoritmo de ponto interior, com *predictor* e *corrector* e uma função objetivo do tipo *barrier*). Ambos fazem uso de paralelismo (i.e., uma simulação em cada *thread*). No primeiro caso, Simplex, o custo computacional não foi diminuído com efetividade, haja vista que cada simulação ocorre de forma independente e o programa cessa quando um dos *threads* obtém resposta ótima. Enquanto no segundo, Barrier, foi obtido um rendimento levemente melhor.

Para simulações MILP ou MILQP, foram usados apenas algoritmos Simplex (primal e/ou dual) para o nó raiz e algoritmos heurísticos sem relaxação para investigação na árvore binária (*Binary Search Tree, BST*). Faltando 10% do tempo computacional restante (que é pré-definido), o algoritmo troca a estratégia para um algoritmo heurístico com relaxação. Diferentemente do caso anterior, alocar uma simulação em cada *thread* é extremamente benéfico. De acordo com o desenvolvedor, o escalonamento entre 8 e 16 *threads* beneficia a performance em até 25%, sem aumentos significativos para uma quantidade maior de *threads*.

É notável mencionar que, dada a argumentação, durante a seção 3. Revisão bibliográfica, a favor de algoritmos de programação matemática, a fim de garantir uma solução ótima global, é, no mínimo, inusitado o uso de algoritmos heurísticos para a BST. Isso se deve

pois, em tempo viável, o *desktop* usado demandaria um número razoavelmente grande de horas para obter uma resposta ótima. Note-se que, com o avanço da tecnologia de processadores é possível apenas trocar o tipo de algoritmo usado e obter resultados em tempos mais modestos.

Diferente de algoritmos heurísticos mencionados em CSOM, em que os mesmos são construídos com o objetivo de explorar os benefícios desse tipo de *solver*, o presente caso trata apenas de uma solução *ad hoc*. Considerando tempos computacionais mais amplos e uma maior capacidade de processamento, é possível trocar alguns parâmetros do *solver*, e retornar a algoritmos determinísticos, sem alterar a estrutura do modelo em si.

O processador ideal para o tipo de problema, como recomendado pelo fabricante, deve possuir alta frequência (*Clock*) e um número considerável de *threads*, que, como mencionado, escala melhor entre 8 – 16 *threads*. A recomendação deixa claro que, quanto maior a frequência, melhor, sendo preferível a um número maior de *threads*.

As informações supracitadas foram encontradas no Arquivo Suplementar “SF_Gurobi_1.pdf” e informações no *site* oficial (disponível em <https://support.gurobi.com/hc/en-us/articles/8172407217041-What-hardware-should-I-select-when-running-Gurobi->, acesso em 21/07/2023), que foi salvo e disponível como Arquivo Suplementar intitulado “SF_Gurobi_2.pdf”).

4.1.2 GEM

O modelo de microrganismo escolhido foi o *iAF1260*, que corresponde a um GEM de *E. coli*, cepa K-12, cultivada em meio de cultura MG 1655 (FEIST *et al.*, 2007), disponível na plataforma BiGG. Esse GEM não é o mais recente, tampouco o com maior número de genes, reações e metabólitos, no entanto foi o usado no artigo original do ReacKnock (XU *et al.*, 2013), sendo assim, para fins de comparação, é recomendado usar esse modelo.

É possível verificar que o mesmo possui, originalmente, 1668 metabólitos, 2382 reações e 1261 genes. As anotações, em termos de reações, metabólitos, genes, subsistemas (classificação do que uma dada reação faz, por exemplo, transporte para o meio extracelular), difere entre as extensões disponíveis. No presente caso, o modelo usado foi o de extensão “.xml” (*Systems Biology Markup Language*, SBML). Esse foi reconstruído fazendo uso do COBRA *toolbox* 2.0. A ferramenta não foi usada para as demais análises. Por exemplo, a assimilação de glicose para *iAF1260.xml* está na reação de índice 849 sob o código

“EX_glc_e_”, enquanto a assimilação de glicose para *iAF1260.mat* está na reação de índice 975 sob o pseudônimo “EX_glc__D_e”.

Essas diferenças nas anotações podem parecer pequenas e inofensivas, no entanto, para uso de rotinas de visualização (e.g., Escher-FBA, ROWE *et al.*, 2018 e IMFLer, PETROVS *et al.*, 2021), isso pode ser muito danoso, haja vista que o modelo não possui mapa associado. Sendo assim, ao carregar os dados da simulação, alguma reação com nome um pouco diferente, pode ser ignorada e constar ausente na representação gráfica. Nesses casos, o ideal é usar modelos com mapas associados, como por exemplo o *iJO1366*, que é muito similar ao *iAF1260*, mais recente e menos suscetível a esse tipo de problema.

Além do problema supracitado, existe outro agente complicador. Algumas reações são artificiais, como mencionado na seção 3.1.1. Fluxômica, isso ocorre para facilitar a modelagem. Ocorre que essas reações, por serem falsas, não podem ser deletadas, sendo assim é necessário desabilitar essa opção no modelo. A classificação dessas reações varia de modelo para modelo, ou mesmo dentro de um GEM, logo as reações podem possuir anotação diferente.

4.1.3 Meio de cultura

Todos os meios de cultura, no contexto de fluxômica, são considerados vazões fixas (i.e., que não variam com o tempo) que entram no ambiente intracelular. Experimentalmente, se possui conhecimento das concentrações de cada metabólito. Porém, aqui, são considerados fluxos reacionais máximos que o microrganismo simulado conseguiria obter. Adicionalmente, a concentração desses compostos no meio extracelular não está sujeita ao balanço de massa e a concentração foi considerada constante. Muito embora existam abordagens dinâmicas que consideram esses.

Adicionalmente, todos os minerais e compostos fundamentais ao metabolismo (e.g., fonte de nitrogênio, micro e macronutrientes) são fornecidos de forma ilimitada, ou seja, estão sempre disponíveis para fins de simulação. O fluxo de oxigênio é considerado, nesse caso, como parte do meio de cultura uma vez que o mesmo é definido concomitantemente com os demais fluxos de substratos. Em outras palavras, isso quer dizer que as únicas opções de limitação, em um meio de cultura, são o gás oxigênio e/ou a fonte de carbono, nesse caso, glicose. Matematicamente, o meio de cultura são restrições de fluxos do transporte externo para o interno ($LB \leq v \leq UB$), que são alteradas antes de qualquer simulação.

Essa seção somente é relevante para o Caso II, o Caso I possui um meio de cultura especial (que não tem significado biológico próprio). Nesse sentido, o único meio de cultura considerado foi o conhecido como glicose mínimo em aerobiose. Se considera um fluxo reacional máximo (do meio extracelular para o meio intracelular) para glicose de 10 mmol/gDW/h (gDW está para gramas de biomassa seca). Para o fluxo de oxigênio se considera, no máximo, 18,5 mmol/gDW/h. Observa-se que esse meio de cultura é comumente usado.

Não faz parte do meio de cultura, no entanto deve ser definido a priori, o ATP de manutenção (ATPM), no mesmo caso, foi considerado como no valor de 8,49 mmol/gDW/h. Diferente de XU *et al.*, 2013, esse valor foi implementado como $LB \leq v$ e não como uma restrição de igualdade. Essa escolha evitou o aumento (desnecessário) de variável dual. A velocidade de formação de biomassa mínima foi fixa em 0,1 /h (tal como em XU *et al.*, 2013).

4.1.4 Pré-processamento

Após definir os novos limites reacionais, de acordo com o meio de cultura de glicose mínimo em aerobiose, foi realizado um FVA. Foi considerado que $\alpha = \delta$ (para o MATLAB, esse valor é igual a, aproximadamente, $2,2 \cdot 10^{-16}$) para a velocidade de formação de biomassa mínima. A tolerância considerada foi de 10^{-8} . Em outras palavras, o FVA retirou todas as reações cuja diferença entre LB_i e UB_i , em relação a zero, foi menor ou igual à tolerância, considerando no mínimo δ da velocidade de formação teórica da biomassa. Na prática, retiraram-se reações que não seriam usadas na simulação por não poderem assumir fluxo de carbono.

Além disso, diferente do praticado por XU *et al.*, 2003, existem reações cujo limite reacional é excessivamente grande, normalmente $M = 999999$ mmol/gDW/h. Esse valor é desconsoante com a assimilação de glicose, então todos os limites, cujo valor foi maior que a nova definição de $M = 99$ mmol/gDW/h, foram substituídos por ele. Note-se que, por se tratar de um problema em que a MFCQ falha em ser verificada nos problemas primal e dual, existem reações que seriam ilimitadas, dessa forma atingindo 999999 mmol/gDW/h. Sendo assim, existem dois benefícios nessa troca: (*i* – Violação de *CS*) a tolerância de viabilidade do problema é definida em 10^{-9} (como mencionado na seção 4.1.5.2.1. Parâmetros do *solver*), um valor

primal da ordem de 10^5 pode provocar uma violação da complementariedade da ordem de 10^{-4} , afetando as condições de otimalidade do problema de forma desnecessária. (*ii* – Pós-processamento) Algoritmos, como o MOMA, como mencionado na seção 3.1.6.2. Métricas arbitrárias, não podem a considerar todo o conjunto AS_{Primal} . Esse somente considera um único ponto, esse ponto, como a MFCQ diz, conteria elementos com o valor 999999 mmol/gDW/h para algumas reações, afetando, negativamente, a ordem de grandeza da função objetivo. Dessa forma seria possível “maquiar” o resultado do MOMA, afirmando que duas sugestões de mutantes estão muito próximas, quando na verdade é uma consequência de um limite reacional inadequado. Essa última mudança não representou retirada de reações do modelo, apenas mudança dos limites de reação.

Após o algoritmo de pré-processamento, o modelo passou a possuir $m = 1032$ metabólitos e $n = 1532$ reações. Todos os algoritmos presentes no Caso II usaram esse mesmo modelo. Note-se que esse algoritmo de pré-processamento define o conjunto FS para aplicação de algoritmos de processamento. O Caso I não possui modelo adequado para pré-processamento. As definições de FS são instanciadas para cada caso.

4.1.5 Processamento

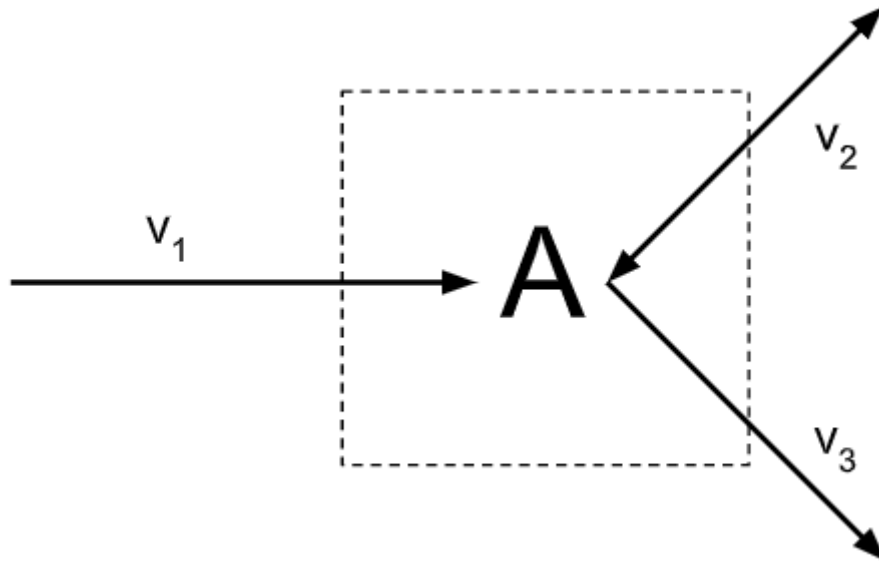
4.1.5.1 Caso I

O presente estudo de caso trata de um caso simplificado a título de exemplificação do exposto nos Anexos A – D mencionados na seção 3. Revisão bibliográfica (i.e., até aonde a abordagem algébrica permitiu chegar). O presente caso de estudo foi sugerido por NAKAMA, 2020 e é utilizado no presente manuscrito com algumas modificações.

Considera-se uma rede metabólica com 1 metabólito ($m = 1$) e 3 reações ($n = 3$). Essas últimas correspondem às seguintes funções: (*i* - v_1) assimilação de substrato irreversível (e.g., glicose). (*ii* - v_2) Produção de produto, que pode virar substrato em certas condições de cultivo (e.g., etanol), portanto uma reação reversível. (*iii* - v_3) Produção de produto irreversível (e.g., gás carbônico para um microrganismo incapaz de assimilar carbono inorgânico). Apesar dos

exemplos, no ambiente intracelular do microrganismo, o composto é chamado de “A”. A Figura 4 ilustra as características supracitas.

Figura 4 - Rede metabólica do Caso I



Fonte: NAKAMA, 2020

Observa-se que, dessa forma, o problema possui 3 dimensões primais, sendo assim possível representar graficamente sem maiores exigências.

Os limites reacionais foram definidos arbitrariamente, sendo, para reações irreversíveis, entre zero e 2 unidades arbitrárias, e para reações reversíveis, entre 2 unidades arbitrárias negativas e 2 unidades arbitrárias. Matematicamente:

$$FS = \left\{ \mathbf{v} \in \mathbb{R}^3 \mid \mathbf{S}\mathbf{v} = 0, \begin{bmatrix} 0 \\ -2 \\ 0 \end{bmatrix} \leq \mathbf{v} \leq \begin{bmatrix} 2 \\ 2 \\ 2 \end{bmatrix} \right\} \quad (31)$$

O problema de otimização sugerido inicialmente é similar à formulação do FBA:

$$\begin{aligned} \max_{\mathbf{v}} \quad & f(\mathbf{v}) = \mathbf{c}(i)^t \mathbf{v} \\ \text{s. t.} \quad & \mathbf{v} \in FS \\ & \mathbf{c}(a) \in C \end{aligned} \quad (32)$$

O vetor objetivo \mathbf{c}^t foi alterado, e o problema de otimização recalculado, duas vezes com o intuito de avaliar o conjunto alternativo primal (AS). Os valores considerados são definidos a seguir:

$$C = \left\{ \mathbf{c} \in \mathbb{R} \mid \mathbf{c}^t(a) = \begin{cases} [0 & 0 & 1] & a = 1 \\ [0 & 1 & 0] & a = 2 \end{cases} \right\} \quad (33)$$

Nenhum algoritmo de pré-processamento foi aplicado. Adicionalmente, os limites reacionais foram definidos arbitrariamente, tal qual cada valor dos coeficientes do vetor de otimização.

Os problemas de otimização foram implementados em MATLAB (Versão R2021b). Em que o algoritmo usado como *solver*, em todos os casos, foi o Dual-Simplex (opção padrão). Para mais informações sobre esse algoritmo a plataforma recomenda a literatura WALTZ *et al.*, 2006.

O principal objetivo desse Caso é apresentar a interpretação gráfica do que foi deduzido nos Anexos A – D. Observa-se que os resultados a serem apresentados motivaram a concepção de algoritmos de pós-processamento a serem apresentados em seção subsequente.

4.1.5.2 Caso II

Foi investigado como as Condições KKT se comportariam no problema interno do BLPP. Esses cálculos são apresentados, principalmente, no Anexo B e C. É possível constatar que a *DF* e *PF* são obrigatoriamente seguidas se a violação das restrições for suficientemente pequena. A *CS*, como mencionado, é substituída pela dualidade forte. Nesse último caso, essa Condição KKT pode não ser respeitada. É difícil afirmar, numericamente, que em todos os casos, a mesma será seguida. Primeiro, pois a forma de abordar a bilinearidade (Anexo D) também interfere nesse problema. Segundo, pois pode depender do problema.

Nesse sentido, a abordagem teórica pode não ser suficiente. Adicionalmente, a ambição desse trabalho não é garantir que, para todos os casos de MPCC linearizado, a *CS* é respeitada. Apenas para CSOM, ou seja, no contexto de biologia de sistemas, é o suficiente.

O Caso I apresenta, visualmente, os cálculos desenvolvidos no Anexo B. Enquanto no Caso II, o presente, se deseja verificar se o significado matemático foi preservado. Para tanto, foram propostas 3 formulações diferentes: (i) *ReacKnock* (implementação própria referente ao artigo original XU *et al.*, 2013), (ii) *ReacKnock* melhorado (*Augmented ReacKnock*, ARK) e (iii) *ReacKnock* melhorado quadrático (*Augmented ReacKnock Quadratic*, ARK-Q). Os modelos, descritos matematicamente, são apresentados nas subseções 4.1.5.2.3. a 4.1.5.2.5. Note-se que todos são MPCC linearizados.

A primeira condição (*ReacKnock*) foi usada para comparar os resultados com os obtidos no artigo original de XU *et al.*, 2013. Trata-se apenas da implementação, seguindo a proposta do autor. A única diferença é a exclusão das reações artificiais do conjunto de reações aptas a

serem deletadas. Por conseguinte, o objetivo nessa seção é obter resultados iguais (ou melhores), quando comparado com o artigo original.

A segunda condição (ARK) não apresenta melhoras em termos de funcionalidade, mas sim de performance.

A terceira condição (ARK-Q) usa as mesmas melhorias da segunda condição e sugere uma função objetivo quadrática, em que se tenta penalizar a perda de significado matemático.

O principal objetivo deste caso é comparar a performance (i.e., se os resultados de rendimento são melhores ou iguais ao estudo original de XU *et al.*, 2013) e se os resultados são ótimos para o problema interno. Para tanto foram propostos diversos algoritmos de pós-processamento. Foi comparado, como resultado “correto”, a versão sequencial após as deleções.

Ambas as condições procuraram maximizar 9 funções objetivo industriais diferentes: succinato, etanol, acetato, (próton) hidrogênio, formiato, glicolato, D-lactato, fumarato e treonina. Sendo assim, o algoritmo foi aplicado 9 vezes para cada condição, totalizando 27 aplicações. Algumas análises de pós-processamento incidiram somente no melhor resultado de cada função objetivo de cada condição. Foram permitidas exatas 5 deleções. Note-se que essa escolha é idêntica à realizada por XU *et al.*, 2013.

4.1.5.2.1 Parâmetros do *solver*

Os parâmetros do *solver* podem ser encontrados em seu manual. Constam diversas opções que podem representar uma diferença notável entre os resultados, inclusive se o mesmo é viável ou não. O principal objetivo, nessa definição, era encontrar uma configuração que, em tempo viável, encontrasse resultados melhores ou iguais aos do artigo original do ReactKnock, para todas as 9 funções objetivo industriais. Em outras palavras, se um *preset* (i.e., conjunto de parâmetros sugeridos) falhasse em encontrar resultado igual ou melhor para pelo menos uma função objetivo, o *preset* era alterado. A descrição de cada parâmetro pode ser encontrada na documentação do *solver*, presente no arquivo suplementar *SF_Gurobi_0.pdf*.

O *preset* define parâmetros rigorosos em termos de precisão numérica para o problema, sendo o mais restritivo para todos eles (*NumericFocus*, *Quad* e *MIPFocus*). Valores notáveis para tal são, tanto para tolerância de otimalidade e tolerância de viabilidade (para variáveis contínuas e binárias), da ordem de 10^{-9} (*OptimalityTol*, *FeasibilityTol* e *IntFeasTol*).

Para pré-processamento (do *framework* sugerido, e não do GEM, como apresentado anteriormente) se realiza a “esparcificação” do modelo (*PreSparsify*), uso de heurísticas para tornar o modelo “mais justo”, tanto dual (*PreDual*), quanto primal (*Presolve*), remoção de linhas linearmente dependentes (*PreDepRow*) e redefinição de restrições a fim de melhorar o condicionamento da matriz de igualdade (*PreCrush*) (no caso BLPP, é muito maior que somente a matriz estequiométrica). Note-se que a heurística acima-mencionada não tem relação com a qualidade do ótimo a ser obtido (i.e., local ou global).

Para o BST do MILP (ou MIQP) considerou-se, em 90% do tempo pré-determinado, um algoritmo heurístico sem relaxação, enquanto para os 10% restantes, se considerou um algoritmo heurístico com relaxação. O objetivo do primeiro é progredir melhor no BST, enquanto o objetivo do segundo é encontrar melhores respostas, por isso se confere menos tempo a essa modalidade. A motivação para o uso de um algoritmo do tipo heurístico é apresentada na seção 4.1.1.1. Tipos de métodos usados. Em outras palavras, com o “poder computacional” disponível, não seria possível realizar o número de simulações desejado em tempo viável.

A título de comparação, foi permitida a inspeção de 4 resultados alternativos organizados de forma decrescente (do melhor para o pior). No entanto, somente foram consideradas opções com as exatas 5 deleções e sem resultados repetidos.

O corte escolhido foi o *Implied bound*, uma vez que o mesmo se encaixa com a proposta do problema, que é delimitar valores viáveis de uma dada variável (impedindo que a mesma assuma valores diferentes de zero no caso de deleções).

O tempo computacional é definido a priori. Para todos os algoritmos e funções objetivo, foram definidos 90 minutos computacionais (logo, para as 9 funções objetivo industriais, totalizam-se 810 minutos). De acordo com o desenvolvedor do Gurobi, o tempo computacional é determinístico e procura ter correspondência de 1:1 com o tempo real. Devido o processador usar todos os seus *threads*, foi perceptível que a razão não foi mantida, demandando mais do que 90 minutos reais para todos os casos. O tempo real também foi mensurado. O uso do *desktop* foi destinado, exclusivamente, para as simulações enquanto essas ocorriam.

O manual não confere mais detalhes acerca dos parâmetros supracitados, no entanto, a combinação de parâmetros foi testada diversas vezes a fim de procurar a que melhor se encaixa com as necessidades.

É válido ressaltar que XU *et al.*, 2013 fizeram uso de um servidor com menos da metade da frequência do processador usado (2,2 GHz), porém com o quádruplo de *threads* (48) (i.e., potencial de paralelização). Note-se que, pelo exposto na seção 4.1.1.1. Tipos de métodos

usados, o número de *threads* era muito maior do que o recomendado (16), resultado um menor aumento de resolução do problema. Não se sabe qual foi o *preset* usado pelos autores, tampouco se o algoritmo da BST foi heurístico. Dado que os resultados foram obtidos em 10 min, é razoável assumir que o algoritmo, para BST, foi heurístico e as tolerâncias menos rígidas. Igualmente razoável assumir que houve a definição de um *preset* para cada um dos 9 alvos.

4.1.5.2.2 Definição de caso sequencial e simultâneo

Cada um dos algoritmos sugeridos (i.e., ReacKnock, ARK e ARK-Q) é um BLPP que é representado por um MPCC, que, subsequentemente, é linearizado pela teoria da dualidade (o procedimento é representado na próxima subseção, detalhes podem ser encontrados nos Anexos A – D). Essa formulação é conotada, no presente manuscrito, como “simultânea”, uma vez que, tanto o problema interno, quanto o externo, são solucionados ao mesmo tempo no mesmo LP. Logo, as denominações: MPCC linearizado, MPCC e caso simultâneo, são equivalentes nesse contexto.

Existem dois problemas possíveis para o caso simultâneo: (*i* – Correspondência) a possibilidade do resultado global do MPCC não condizer com o BLPP (e, portanto, perder a correspondência de representação matemática). (*ii* – Otimalidade do FBA) Dada a simplificação apresentada no Anexo C, não garantir que o resultado do FBA (problema interno de todas as formulações) seja ótimo. (*iii* – Os dois problemas juntos) Como já apresentado na literatura (MARANAS e ZOMORRODI, 2016), é possível observar os dois ao mesmo tempo. Nesse caso, o resultado do MPCC linearizado coincide com o de um FVA da função objetivo industrial. Dessa forma, não se garante a otimalidade do FBA, uma vez que não é possível satisfazer a função objetivo biológica e industrial simultaneamente com a quantidade de carbono fornecida. Por conseguinte, o resultado ótimo do MPCC também não condiz com o do BLPP.

Para fins de comparação, foi usado o caso sequencial que é interpretado, no presente manuscrito, como “correto” e adotado como padrão de comparação. Note-se que o caso sequencial é exatamente a proposta do BLPP: (*i* – FBA) se realiza um FBA, que obtém o máximo da função objetivo biológica. Tal como realizado no caso simultâneo, essa se transforma em uma restrição de outro problema de otimização. (*ii* – FVA) Assumindo um $\alpha = 1$, tem-se o resultado da abordagem sequencial. Em termos matemáticos:

$$\begin{aligned}
& \max_{\mathbf{v}} && \mathbf{c}^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
& \text{s. t.} && \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
& && \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
& && \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
\end{aligned} \tag{34}$$

Para a segunda parte, tem-se que:

$$\begin{aligned}
& \max_{\mathbf{v}} && \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{ind} \\
& \text{s. t.} && \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
& && \mathbf{LB}_\alpha \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}_\alpha \\
& && \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
\end{aligned} \tag{35}$$

Em que $\mathbf{c}_2 \in \mathbb{R}^n$ é o vetor de otimização do problema da Equação 35, que é unitário com o único elemento não nulo no índice correspondente a reação objetivo industrial. Os limites reacionais \mathbf{LB}_α e \mathbf{UB}_α são limites reacionais iguais a \mathbf{LB} e \mathbf{UB} , porém, no índice de formação de biomassa, tem-se que $LB_{i_{bio}} = \alpha v_{bio}$ e $UB_{i_{bio}} = \alpha v_{bio}$.

Da forma que o problema da Equação 35 é implementado, gera-se uma dependência linear entre as variáveis duais $\mu_{1_{bio}}$ e $\mu_{2_{bio}}$ (variáveis duais associadas aos limites reacionais da formação de biomassa), em que a primeira está associada ao limite inferior e a segunda ao superior. Note-se que ambas podem assumir qualquer valor desde que respeitem que a diferença de ambas seja igual a um valor fixo. No entanto, note-se que as análises a serem conduzidas sobre variáveis duais levam em conta o FBA, a ser discutido em seção subsequente. Dessa forma, a dependência linear não é relevante para futuras análises.

É razoável questionar o porquê do caso sequencial não ser usado para identificar deleções (i.e., solucionar o MILP). Como mencionado na seção 3.1.5.1. OptKnock (BURGARD *et al.*, 2003), essa estratégia demandaria muito mais tempo que o caso simultâneo, podendo ser inviável solucionar em tempo viável.

As abordagens simultâneas são apresentadas nas seções a seguir. Nos casos em que o FVA foi realizado, assumiu-se que $\alpha = 1$. No entanto, note-se que o FBA, após as deleções, possui resultado de função objetivo menor quando comparado a WT. Além disso o FVA possui um número de variáveis muito maior do que o caso sequencial (n variáveis para o caso sequencial vs. $n + 2m + 4n + n$ para o ReacKnock e $n + m + 4n + n$ para ARK e ARK-Q). Por conseguinte, para os demais, o tempo computacional para realização de um FVA foi muito maior.

4.1.5.2.3 ReacKnock

A formulação do BLPP do ReacKnock foi apresentada na seção 3.1.5.3. ReacKnock (XU *et al.*, 2013) pela Equação 30, enquanto o MPCC linearizado é apresentado na presente seção. Ambos são apresentados, também, no artigo original, porém o programa não foi fornecido pelos autores. Sendo assim, procurou-se implementar o mesmo considerando o proposto pelos autores:

$$\begin{array}{ll}
 \max_{\mathbf{y}, \mathbf{v}} & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
 \text{s. t.} & \max_{\mathbf{v}} \quad \mathbf{c}_1^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
 & \text{s. t.} \quad \mathbf{S} \mathbf{v} \leq \mathbf{0} \\
 & \quad -\mathbf{S} \mathbf{v} \leq \mathbf{0} \\
 & \quad \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \quad \mathit{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathit{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{UB} \\
 & \quad \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \\
 & \quad {}^t \mathbf{y} = n - K \\
 & \quad \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
 \end{array} \tag{36}$$

Levemente diferente do problema da Equação 30, a Equação 36 altera a restrição dos limites reacionais a fim de se tornar mais simples. Note-se que *diag* é uma função (conotada, no presente manuscrito, como função diagonal), em que $\mathit{diag}: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^{n \times n}$, que, em outras palavras, transforma um vetor em uma matriz diagonal cujos elementos da diagonal principal condizem com os elementos do vetor.

É possível obter a dedução do problema da Equação 36 pelo exposto nos Anexos B – D. (*i* – BLPP para MPCC) É notável que \mathbf{y} (vetor das variáveis binárias) é tratado como parâmetro para o problema interno (FBA) e tem-se mais restrições que um FBA canônico, ademais, a dedução segue idêntica à apresentada nos Anexos B e C. (*ii* – Bilinearidade) A não linearidade é solucionada da forma descrita no Anexo D. Logo, a dedução do ReacKnock em si não é apresentada. Sendo assim é possível se obter o MPCC linearizado:

$$\begin{aligned}
& \min \\
& \mathbf{v}, \lambda_1, \lambda_2, \\
& \mu_1, \mu_2, \mu_3, \\
& \mu_4, \mathbf{y}
\end{aligned}
\quad -\mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj}$$

$$\begin{aligned}
& \left[\begin{array}{cccccccc|c}
\mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & -\mathbf{1} \\
\mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{1} \\
\mathbf{S} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\
-\mathbf{S} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\
-\mathbf{I} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\
\mathbf{I} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\
-\mathbf{I} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathit{diag}(\mathbf{LB}) \\
\mathbf{I} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & -\mathit{diag}(\mathbf{UB}) \\
\mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{M} \cdot \mathbf{I} \\
\mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I} & \mathbf{M} \cdot \mathbf{I}
\end{array} \right] \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} \leq \begin{bmatrix} n-K \\ K-n \\ \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \\ -\mathbf{LB} \\ \mathbf{UB} \\ \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \\ \mathbf{M} \\ \mathbf{M} \end{bmatrix}
\end{aligned}
\tag{37}$$

$$\begin{aligned}
& \left[\begin{array}{cccccccc|c}
\mathbf{0} & \mathbf{S}^t & -\mathbf{S}^t & -\mathbf{I} & \mathbf{I} & \mathbf{I} & -\mathbf{I} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\
-\mathbf{c}^t & -(\mathbf{S}\mathbf{k})^t & (\mathbf{S}\mathbf{k})^t & (\mathbf{k} - \mathbf{LB})^t & (\mathbf{UB} - \mathbf{k})^t & \mathbf{k}^t & -\mathbf{k}^t & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\
\mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{NK} & \mathbf{0}
\end{array} \right] \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{c} \\ -\mathbf{c}^t \mathbf{k} \\ \mathbf{1} \end{bmatrix}
\end{aligned}
\tag{C.E. 1}$$

$$\begin{aligned}
& \lambda_1, \lambda_2, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \geq \mathbf{0} \\
& \mathbf{v}, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n \\
& \lambda_1, \lambda_2 \in \mathbb{R}^m \\
& \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
\end{aligned}
\tag{C.E. 2}$$

$$\begin{aligned}
& \lambda_1, \lambda_2, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \geq \mathbf{0} \\
& \mathbf{v}, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n \\
& \lambda_1, \lambda_2 \in \mathbb{R}^m \\
& \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
\end{aligned}
\tag{C.E. 3}$$

Nessa seção, e nas demais seções em que se apresentam os algoritmos (4.1.5.2.4. ARK e 4.1.5.2.5. ARK-Q) as colunas das matrizes estão na mesma ordem que o vetor das variáveis de otimização (abaixo da denotação de minimização ou maximização da função objetivo). No presente caso: $\mathbf{v}, \lambda_1, \lambda_2, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4, \mathbf{y}$.

Em que λ_1 e λ_2 são variáveis duais (do problema interno da Equação 30) associadas às restrições de desigualdade $\mathbf{S}\mathbf{v} \leq \mathbf{0}$ e $-\mathbf{S}\mathbf{v} \leq \mathbf{0}$. As variáveis μ_1 e μ_2 são variáveis duais associadas às restrições de desigualdade $\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$, enquanto μ_3 e μ_4 são variáveis duais associadas às restrições de desigualdade $\mathit{diag}(\mathbf{y})\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathit{diag}(\mathbf{y})\mathbf{UB}$.

As constantes $\mathbf{0}$ e $\mathbf{1}$ são vetores com zero e um em todos os elementos com dimensão compatível a da multiplicação vetorial. O mesmo é válido para $M \in \mathbb{R}$ e $\mathbf{M} \in \mathbb{R}^n$, em que todos os elementos do vetor \mathbf{M} possuem valores iguais a M , que, para esse modelo (e todos os demais) é $M = 10^2 - 1$. A ordem de grandeza foi determinada pela ordem da assimilação de substrato considerada (conforme descrito na seção 4.1.3. Meio de cultura).

A constante $\mathbf{k} \in \mathbb{R}^n$ também é pré-definida e possui significado matemático apresentado no Anexo B. Nesse caso, assim como nos demais algoritmos, se considerou $\mathbf{k} = \mathbf{0}$. O valor foi escolhido como zero, pois qualquer valor positivo e negativo aumenta, gradativamente, o (mal) condicionamento da matriz das restrições de igualdade. Enquanto, por um lado, é notável que valores próximos pequenos para \mathbf{k} não interferem significativamente no condicionamento além de exercerem influência, que pode ser benéfica, na convergência. Por outro lado, é possível considerar um \mathbf{k} arbitrariamente grande, prejudicando o condicionamento

e aumentando, arbitrariamente, a possibilidade de violação dessa restrição. Dessa forma é possível obter (mais facilmente) um resultado não ótimo para o problema interno. Essa relação não foi estudada no presente manuscrito.

A matriz NK corresponde a todos as reações que não podem ser deletadas, nesse caso, esse conjunto é composto por reações artificiais. Note-se que não existe nenhum prejuízo prático, apenas benefícios. Reações artificiais são teóricas e permitem, na maioria dos casos, o transporte entre o meio intracelular para o meio extracelular, geralmente esse caminho é linear, sem reações em paralelo, adjacente a reações reais (e.g., “EX_o2_e”, sumidouro de oxigênio – presente na matriz NK , “O2tex”, transporte de oxigênio via difusão – pode ser deletado). Ao todo foram 103 reações protegidas, com valores fixos para as variáveis binárias. Para fins de aumento de performance, essas variáveis foram convertidas em contínuas com valor fixo por uma restrição de igualdade. Note-se que essa mudança não possui viés biológico (i.e., não foram considerados mecanismos biológicos para tal) e, provavelmente, não estava presente na formulação original. A mesma estratégia foi implementada no presente algoritmo pois os demais (i.e., ARK e ARK-Q) fazem uso da mesma. Dado que um dos objetivos é comparar performance, seria possível assumir que a melhora de performance dos concorrentes é atribuída a essa estratégia.

O escalar K dita quantas deleções são permitidas, nesse caso, assim como nos demais, foi fixo em 5 deleções, portanto $K = 5$.

As variáveis de otimização do ReacKnock são constituídas por $\mathbf{v}, \lambda_1, \lambda_2, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4, \mathbf{y}$. Ao todo são 11256 variáveis, em que (teoricamente) 1532 são binárias, porém apenas 1429 possuem liberdade real de deletar uma dada reação. A matriz das restrições de desigualdade conta com 11258 restrições, enquanto a de igualdade conta com 1636 restrições (12894 restrições ao todo).

As restrições $C.I.1$ e $C.I.2$ versam sobre os limites de deleção (fixos em 5 deleções possíveis). As restrições $C.I.3$ e $C.I.4$ são a representação da matriz estequiométrica, que, os autores separaram em duas desigualdades a fim de seguir o modelo fornecido por AUDET *et al.*, 1997, artigo que eles embasaram o MPCC simplificado. As restrições $C.I.5$ – $C.I.8$ são os limites reacionais sem e com variáveis binárias, respectivamente, a fim de representar a deleção. Note-se que, da forma como está, as variáveis binárias agem como uma espécie de interruptor, desligando ou ligando os limites reacionais. As restrições $C.I.9$ e $C.I.10$ limitam, por cima, as variáveis duais μ_3 e μ_4 , característica presente no artigo original (XU *et al.*, 1997), quando existe deleção, quando não existe a mesma é restrita a zero. Essa é uma característica

complementar da abordagem das bilinearidades no MPCC linearizado (conforme abordado no Anexo D).

A restrição *C.E. 1* representa a *DF* (Condição KKT referente aos “balanços de força”). A restrição *C.I. 2* representa a dualidade forte, que, como mencionado, depende de \mathbf{k} que é previamente especificado. Por fim, a restrição *C.I. 3* representa as reações que não podem ser deletadas pois não existem (reações artificiais).

Apesar da formulação presente nessa seção ter a ambição de ser fiel ao artigo original (XU *et al.*, 2013), existem algumas diferenças. (i) As restrições *C.I. 1* e *C.I. 2* permitiam um número menor que o número (fixo) de deleções. Não é do interesse do presente estudo verificar essa possibilidade. Essa alteração possui impacto positivo na performance. (ii) No artigo original $M = 10^2$, subtraiu-se 1 pois o mesmo valor de $M = 10^2 - 1$ foi usado para todos os outros algoritmos. Essa alteração, na prática, não possui diferença tanto funcional quanto em performance. (iii) A dualidade forte não depende de \mathbf{k} , e como mencionado em 3.1.3.6.1. Dualidade forte e fraca, essa descrição matemática da dualidade lagrangeana, para o caso linear, não foi encontrado na literatura. Essa alteração, na prática, não possui diferença tanto funcional quanto em performance. (iv) As reações artificiais de transporte extracelular foram retiradas do conjunto de reações que podem ser deletadas (através da restrição *C.E. 3*). Essa performance prevê aumento de performance, dado que, com menos variáveis binárias, é possível diminuir a árvore binária.

Como mencionado, procurou-se maximizar 9 funções objetivo industriais diferentes: succinato, etanol, acetato, (próton) hidrogênio, formiato, glicolato, D-lactato, fumarato e treonina. Sendo assim, o algoritmo foi aplicado 9 vezes para cada condição. O *preset* de parâmetros do *solver* (mencionado na seção 4.1.5.2.1. Parâmetros do *solver*), limita o tempo computacional em 90 minutos para cada um dos alvos.

4.1.5.2.4 ARK (Augmented ReacKnock)

Enquanto o algoritmo anterior baseou-se, da melhor forma possível, no artigo original do ReacKnock (XU *et al.*, 2013), a presente possui a ambição de melhorar a performance de seu antecessor (por isso o *Augmented*, “melhorado” em tradução direta). Para tanto algumas alterações foram realizadas na formulação do ReacKnock:

$$\begin{aligned}
& \max \\
& \mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, \\
& \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \\
& \boldsymbol{\mu}_4, \mathbf{y}
\end{aligned}
\quad \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj}$$

$$\begin{aligned}
& \text{s. t.} \quad \begin{bmatrix} -I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \text{diag}(\mathbf{LB}) & 0 \\ I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -\text{diag}(\mathbf{UB}) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & I & 0 & M \cdot I & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & I & M \cdot I & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \boldsymbol{\lambda} \\ \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \\ \boldsymbol{\mu}_3 \\ \boldsymbol{\mu}_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} \leq \begin{bmatrix} -\mathbf{LB} \\ \mathbf{UB} \\ 0 \\ 0 \\ M \\ M \end{bmatrix} \quad \begin{aligned} & (C.I.1) \\ & (C.I.2) \\ & (C.I.3) \\ & (C.I.4) \\ & (C.I.5) \\ & (C.I.6) \end{aligned}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& \begin{bmatrix} 0 & \mathbf{S}^t & -I & I & -I & I & 0 \\ -\mathbf{c}^t & -(\mathbf{S}\mathbf{k})^t & (\mathbf{k} - \mathbf{LB})^t & (\mathbf{UB} - \mathbf{k})^t & \mathbf{k}^t & -\mathbf{k}^t & 0 \\ \mathbf{S} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \mathbf{NK} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \boldsymbol{\lambda} \\ \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \\ \boldsymbol{\mu}_3 \\ \boldsymbol{\mu}_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{c} \\ -\mathbf{c}^t \mathbf{k} \\ 0 \\ n - K \\ 1 \end{bmatrix} \quad \begin{aligned} & (C.E.1) \\ & (C.E.2) \\ & (C.E.3) \\ & (C.E.4) \\ & (C.E.5) \end{aligned}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& -M \leq \boldsymbol{\lambda} \leq M \\
& 0 \leq \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4 \leq M \\
& \mathbf{v}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4 \in \mathbb{R}^n \\
& \boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^m \\
& \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
\end{aligned}$$

As constantes e dimensões dos vetores possuem a mesma descrição da apresentada na seção anterior (4.1.5.2.3. *ReacKnock*). Portanto são apresentadas apenas as mudanças entre ambas:

(i – Simplificação da restrição de igualdade) A formulação *ARK* possui $\mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4, \mathbf{y}$ variáveis de otimização (com o mesmo significado biológico e matemático). Porém houve uma diminuição de variáveis devido às restrições *C.I.3* e *C.I.4* (da formulação *ReacKnock*) terem sido aglutinadas em uma única restrição de igualdade. Dessa forma as variáveis duais associadas possuem metade da dimensão, ao invés de necessitar de duas, $\boldsymbol{\lambda}_1$ e $\boldsymbol{\lambda}_2$ para o *ReacKnock*, e apenas $\boldsymbol{\lambda}$ para *ARK*. Essa mudança representa um aumento significativo de performance, são 1032 variáveis a menos.

(ii – Simplificação do limite de deleções) As restrições *C.I.1* e *C.I.2* da formulação *ReacKnock* foram aglutinadas em uma única igualdade, porém o possível aumento de performance por essa mudança é marginal. Evitar representar restrições de igualdade como duas de desigualdade, é uma prática dita como benéfica para *solvers* que fazem uso do algoritmo Simplex. Problemas que são bem condicionados podem se tornar problemáticos fazendo uso dessa metodologia (IM e WOLKOWICZ, 2023). Note-se ainda que a redução da deficiência pelas linhas ocasionada, principalmente, pelas restrições referentes a matriz estequiométrica, possui impacto positivo nas variáveis duais.

(iii – Reações letais) As reações que não podem ser deletadas foram atualizadas, em adição as reações artificiais, foram adicionadas ainda reações letais. Essa interpretação foi sugerida em MACHADO *et al.*, 2016, a mesma diz que qualquer reação com fluxo não nulo no FVA (para minimização) pode ser considerada como letal. Nesse caso essas reações que também

foram removidas do conjunto das aptas a deleção, totalizam-se 105. O mesmo procedimento de converter essas em contínuas foi realizado. O aumento de performance por essa mudança pode ser considerado marginal, muito embora possua significado biológico e possa variar caso a restrição de formação de biomassa mínimo varie ou se considerado outro GEM.

(iv – Limitação das variáveis duais) Devido à matriz estequiométrica ser deficiente pelas linhas elimina-se a possibilidade do problema interno (FBA) ser qualificado por ambas LICQ e MFCQ. Sendo assim, as variáveis duais são ilimitadas e não únicas, se torna plausível limitar todas por um valor palpável. É difícil avaliar o impacto dessa modificação, no entanto é razoável assumir que afeta, positivamente, a convergência do *solver*, uma vez que restringe os valores das variáveis de otimização a valores palpáveis.

(v – Sentido da otimização) Por fim, a última modificação foi na função objetivo, que, ao invés de considerar minimização de uma função objetivo negativa, se considerou a maximização da mesma desacompanhada do sinal negativo. Essa mudança não possui impacto na performance.

A formulação ARK possui 10224 variáveis de otimização, em que (teoricamente) 1532 são binárias, porém apenas 1427 possuam liberdade real para deletar uma dada reação. A matriz das restrições de desigualdade possui 9192 restrições, enquanto a matriz das restrições de igualdade possui 2627 restrições (11819 restrições ao todo).

As restrições *C.I. 1 - C.I. 4* representam os limites reacionais sem e com as variáveis binárias, que representam a possibilidade de se realizar uma deleção. As restrições *C.I. 5 e C.I. 6* é uma restrição complementar à abordagem das bilinearidades (conforme apresentado no Anexo D). A restrição *C.E. 1* representa *DF*, *C.E. 2* a dualidade forte, *C.E. 3* a matriz estequiométrica, *C.E. 4* o número de deleções e *C.E. 5* as reações não aptas a serem deletadas.

Como mencionado, procurou-se maximizar 9 funções objetivo industriais diferentes: succinato, etanol, acetato, (próton) hidrogênio, formiato, glicolato, D-lactato, fumarato e treonina. Sendo assim, o algoritmo foi aplicado 9 vezes para cada condição. O *preset* de parâmetros do *solver* (mencionado na seção 4.1.5.2.1. Parâmetros do *solver*), limita o tempo computacional em 90 minutos para cada um dos alvos.

4.1.5.2.5 ARK-Q (Augmented ReacKnock Quadratic)

Diferente do caso anterior, o presente não procura aumentar a performance (ainda que faça uso das restrições do ARK, e não do ReacKnock), mas sim garantir a otimalidade do problema interno (FBA) do BLPP (apresentado na Equação 30). Espera-se, como dano colateral, diminuição da performance.

$$\begin{aligned}
 & \max_{\mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4, \mathbf{y}} \quad v_{obj} + \delta(\mathbf{LB}^t \boldsymbol{\mu}_1 + \mathbf{UB}^t \boldsymbol{\mu}_2) - \delta(\mathbf{x}^t \mathbf{Q} \mathbf{x}) \\
 & \text{s. t.} \quad \begin{bmatrix} -I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ -I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \text{diag}(\mathbf{LB}) & \mathbf{0} \\ I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & -\text{diag}(\mathbf{UB}) & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & \mathbf{0} & M \cdot I & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & M \cdot I & \mathbf{0} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \boldsymbol{\lambda} \\ \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \\ \boldsymbol{\mu}_3 \\ \boldsymbol{\mu}_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} \leq \begin{bmatrix} -\mathbf{LB} \\ \mathbf{UB} \\ \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \\ M \\ M \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} (C.I.1) \\ (C.I.2) \\ (C.I.3) \\ (C.I.4) \\ (C.I.5) \\ (C.I.6) \end{array} \\
 & \begin{bmatrix} \mathbf{0} & S^t & -I & I & -I & I & \mathbf{0} \\ -c^t & -(\mathbf{S}k)^t & (k - \mathbf{LB})^t & (\mathbf{UB} - k)^t & k^t & -k^t & \mathbf{0} \\ S & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & 1 \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & NK \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \boldsymbol{\lambda} \\ \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \\ \boldsymbol{\mu}_3 \\ \boldsymbol{\mu}_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c \\ -c^t k \\ \mathbf{0} \\ n - K \\ 1 \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} (C.E.1) \\ (C.E.2) \\ (C.E.3) \\ (C.E.4) \\ (C.E.5) \end{array} \\
 & \begin{array}{l} -M \leq \boldsymbol{\lambda} \leq M \\ \mathbf{0} \leq \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4 \leq M \\ \mathbf{v}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4 \in \mathbb{R}^n \\ \boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^m \\ \mathbf{y} \in \{0,1\}^n \end{array} \quad (39)
 \end{aligned}$$

Em que \mathbf{x} (somente nesse caso) representa todas as variáveis de otimização do problema, em um único vetor e na seguinte ordem: $\mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4, \mathbf{y}$. Por fim, $\delta \cong 2,22 \cdot 10^{-14}$. É possível verificar que todas as restrições permanecem iguais (e, portanto, seguem a mesma estratégia mencionada na seção anterior, 4.1.5.2.4. ARK).

A matriz \mathbf{Q} é tal que:

$$\mathbf{Q} = \begin{bmatrix} \mathbf{v} & \boldsymbol{\lambda} & \boldsymbol{\mu}_1 & \boldsymbol{\mu}_2 & \boldsymbol{\mu}_3 & \boldsymbol{\mu}_4 & \mathbf{y} \\ \mathbf{v} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \boldsymbol{\lambda} & \mathbf{0} & I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \boldsymbol{\mu}_1 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \boldsymbol{\mu}_2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & I & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \boldsymbol{\mu}_3 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & I & \mathbf{0} \\ \boldsymbol{\mu}_4 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & \mathbf{0} \\ \mathbf{y} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I \end{bmatrix} \quad (40)$$

Note-se que existem destaques para as variáveis $\mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4, \mathbf{y}$. Essas não estão presentes na matriz de fato, apenas aparecem em sua representação para facilitar a inspeção visual.

Observa-se que \mathbf{Q} é uma matriz quadrada, triangular superior e esparsa, observa-se ainda que $\mathbf{Q} \in \mathbb{R}^{6n+m \times 6n+m}$. Na diagonal principal, todos os elementos são não nulos exceto para os correspondentes a \mathbf{v} . Isso se deve ao teorema do conjunto das soluções ótimas alternativas (apresentado na seção 3.1.3.4 Unicidade):

$$AS_{Primal} = \{ \mathbf{x} \in X \mid \nabla f(\bar{\mathbf{x}})^t (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) = 0, \nabla f(\bar{\mathbf{x}}) = \nabla f(\mathbf{x}) \} \quad (41)$$

A segunda parte da definição do conjunto, $\nabla f(\bar{\mathbf{x}}) = \nabla f(\mathbf{x})$, permite que a matriz \mathbf{Q} garanta que o ótimo obtido, pelo menos para \mathbf{v} , seja fraco.

Um dos problemas, como mencionado, é a não unicidade das variáveis duais. Esse problema é parcialmente mitigado, uma vez que a diagonal principal não nula de \mathbf{Q} garante que o máximo achado seja forte para as variáveis duais.

Na primeira linha, as duas matrizes identidade geram os termos $v_i \mu_{1_i}$ e $v_i \mu_{2_i}$ (para todo $i \in I$), que, combinados com $\delta(\mathbf{LB}^t \boldsymbol{\mu}_1 + \mathbf{UB}^t \boldsymbol{\mu}_2)$, fornecem *CS*, penalizando a função quando a mesma é violada. Adicionalmente, quando existe, simultaneamente, $\mu_{1_i} > 0$ e $\mu_{2_i} > 0$ a função objetivo também é penalizada. O mesmo raciocínio é válido para μ_{3_i} e μ_{4_i} . Todas as penalizações vêm acompanhadas de δ , que garante que as penalizações não diminuam o valor da função objetivo. Essa estratégia também foi adotada por DE OLIVEIRA *et al.*, 2023 e PLOCH *et al.*, 2020.

Para o presente manuscrito, diferente dos estudos acima-mencionados, não se deseja a unicidade dos fluxos primais (i.e., ótimo forte). Se deseja a degeneração desses fluxos para fins de comparação com o ReacKnock e ARK, que, ambos, possuem essa característica.

Observa-se que, tanto a função objetivo, quanto a simplificação entre MPCC e MPCC linearizado (considerando uma *CS* mais branda, como apresentado no Anexo C) não garante que *CS* seja contemplada do ponto de vista numérico:

$$\underbrace{\begin{bmatrix} \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \mathbf{v} - \mathbf{LB} \\ \mathbf{UB} - \mathbf{v} \end{bmatrix}}_{CS \text{ mais branda}} = 0 \neq \underbrace{\begin{matrix} \mu_{1_i}(v_i - LB_i) = 0 \\ \mu_{2_i}(UB_i - v_i) = 0 \end{matrix}}_{CS} \quad i \in I \quad (42)$$

No presente caso, a perpendicularidade (lado esquerdo da Equação 42), equivale a complementariedade (lado direito da Equação 42). Isso se deve a ambos os termos da multiplicação serem maiores ou iguais a zero. Nesse sentido, a função objetivo de ARK-Q consegue penalizar qualquer violação nesse sentido.

A alteração da função objetivo, mesmo com as penalizações, não garante a otimalidade do problema interno. Espera-se que a mesma haja, de maneira mais ativa, nas variáveis duais, de forma que as mesmas obtenham um resultado único para o problema externo. Enquanto nas

variáveis primais deva ser indiferente, haja vista que a degeneração deva ser preservada. Pela magnitude das penalizações não se espera que a estratégia de deleções varie entre os algoritmos.

Assim como os demais algoritmos, procurou-se maximizar 9 funções objetivo industriais diferentes: succinato, etanol, acetato, (próton) hidrogênio, formiato, glicolato, D-lactato, fumarato e treonina. Sendo assim, o algoritmo foi aplicado 9 vezes para cada condição. O *preset* de parâmetros do *solver* (mencionado na seção 4.1.5.2.1. Parâmetros do *solver*), limita o tempo computacional em 90 minutos para cada um dos alvos.

4.1.6 Pós-processamento

4.1.6.1 Caso I

O principal objetivo, nesse caso, da análise de pós-processamento, é reiterar qual a interpretação geométrica do exposto, principalmente, nos Anexos A–D. Para tanto, foram feitas duas análises principais: (i) Foram avaliados os valores das variáveis duais após a simulação. Note-se que, nesse caso, diferente dos demais, o problema segue a LICQ, e, portanto, as variáveis duais são únicas. O próprio *solver* possui uma recomendação da aquisição desses dados, logo, não houve necessidade de implementação de rotina. (ii) Foram exportadas figuras tridimensionais a fim de facilitar a inspeção visual.

4.1.6.2 Caso II

O principal objetivo, nesse caso, foi avaliar a otimalidade do problema interno e possíveis perdas de comunicação entre o MPCC linearizado e o BLPP. Adicionalmente, foi possível avaliar a performance dos algoritmos. Os resultados são expostos por uma tabela resumo e foram propostos cinco algoritmos de pós-processamento (*Post-Processing Algorithms*, PPA).

Existem diversos tipos de violação (VT) avaliados:

(i – VT.1) Caso uma ou mais condições de otimalidade do problema interno sejam violadas, então existe perda de correspondência entre as variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker do problema interno. Dessa forma, as variáveis duais perdem significado matemático e se tornam apenas variáveis de otimização do problema interno. Não necessariamente o resultado das variáveis primais se torna errado com esse tipo de violação. Avaliado pela PPA.1 e PPA.2.

(ii – VT.2) É possível que a região viável do problema BLPP não seja a mesma do MPCC linearizado. Isto é, apesar da função objetivo industrial e biológica obtiverem resultados ótimos para ambos os problemas, pode ser que os fluxos reacionais para isso ocorrer sejam diferentes (e, portanto, possuam um AS_{Primal} diferente). Se alguma discrepância for encontrada essa é chamada de “perda de significado geométrico”. Avaliado pelo PPA.3.

(iii – VT.3) Similar a VT.1, pode ser que mesmo que CS seja verificada (assim como as outras Condições KKT), pode ocorrer que as variáveis primais ainda consigam variar, mesmo com $\mu_i > 0$ (detalhes dessa interpretação estão presentes nos resultados do Caso I). Dessa forma também existe perda de significado matemático entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Assim como para a VT.2, se alguma discrepância for encontrada essa é chamada de “perda de significado geométrico”. Avaliado pelo PPA.3.

(iv – VT.4) Similar VT.2, o conjunto AS_{Dual} pode ser diferente entre o caso sequencial (representação do BLPP) e o MPCC linearizado. Dessa forma pode ser que não exista perda de significado matemático, mas ambos os conjuntos serem diferentes chama a atenção para investigações futuras. Avaliado pelo PPA.4.

(iv – VT.5) A violação da Slater CQ, para LP, não possui o mesmo significado para os demais casos de programação linear (em LP a dualidade forte continua sendo válida, mesmo sem a Slater CQ). A mesma não possui significado prático, mas violação da mesma foi investigada. A principal motivação foi a mesma ser condição suficiente do Teorema 2.1 do estudo de DEMPE e DUTTA, 2012. Esse teorema diz, resumidamente, que quando a Slater CQ é satisfeita, um MPCC possui um ótimo igual ao de um BLPP. Avaliado pelo PPA.5.

Todas as análises, que dependeram da resolução de problemas de otimização, contam com três dados de processamento importantes: (i) violação máxima das restrições, (ii) número de iterações e (iii) tempo computacional (*work units*).

Todas as rotinas foram implementadas de forma serem independentes umas das outras, sendo assim, nenhum PPA influenciou no outro. O PPA.3, por exemplo, realiza um FVA de todas as variáveis primais, enquanto o PPA.5 realiza um FVA de alguns alvos. Em nenhum deles

houve a troca de informações, sendo assim, em alguns casos, o mesmo resultado foi obtido duas vezes.

Todos os resultados dos PPAs podem ser encontrados, na íntegra, em arquivos suplementares dada a magnitude de algumas planilhas. É possível consultar a Lista de Arquivos Suplementares para maiores informações.

4.1.6.2.1 Tabela resumo

A tabela resumo fornece informações de todas as soluções (incluindo as alternativas), que sugeriram exatas 5 deleções em alvos únicos. A mesma apresenta os valores de função objetivo industrial e biológica ótimos e os alvos de deleção (reacionais).

Existem outros elementos que fazem parte dos PPAs, que estão presentes para, facilmente, identificar quais soluções respeitam a otimalidade do problema interno do BLPP (FBA). Essa verificação foi executada do seguinte modo:

(i – sequencial vs. simultâneo) a resolução do MPCC linearizado permite, facilmente, obter dados das funções objetivo industrial e biológica. Sendo assim, foram realizadas simulações no caso sequencial a fim de obter os mesmos dados (como apresentado na seção 4.1.5.2.2. Definição de caso sequencial e simultâneo). Observa-se que, a priori, foram consideradas as mesmas deleções.

(ii – Métricas) Foram obtidas métricas para fins de comparação (somente no caso sequencial), FBA, maximização da função objetivo industrial (sem restrição), chamado, no presente manuscrito, de FVA_{free} , e maximização da função objetivo industrial sujeita ao resultado do FBA, chamado, no presente manuscrito, de FVA_{sub} . Cada uma das três métricas foram obtidas tanto para WT (FBA^{WT} , FVA_{free}^{WT} e FVA_{sub}^{WT}) quanto para o mutante com as deleções (FBA^{Strain} , FVA_{free}^{Strain} e FVA_{sub}^{Strain}).

(iii – Comparação) Comparou-se a função objetivo industrial do MPCC linearizado com FVA_{sub}^{Strain} e a velocidade de formação de biomassa do MPCC linearizado com FBA^{Strain} . Se a primeira comparação obtiver resultados iguais, então o problema possui Correspondência entre o MPCC linearizado e o BLPP original. Se a segunda comparação obtiver resultados iguais, então a Otimalidade do FBA (problema interno do BLPP) é verificada. As duas expressões vêm em destaque pois fazem alusão ao explanado na seção 4.1.5.2.2. Definição de caso sequencial

e simultâneo. As comparações estão sujeitas a precisão numérica do *software* utilizado, qualquer valor com diferença menor ou igual a 10^{-6} foi considerado igual. Note-se que é um valor consideravelmente baixo, haja vista que a violação máxima da viabilidade foi definida em 10^{-9} .

A comparação supracitada se trata apenas de uma verificação grosseira para fins de identificação de mutantes passíveis ou não de consideração. Análises mais profundas são abordadas na seção a seguir.

4.1.6.2.2 PPA.1: Violação da definição de CS - I

Esse PPA tem como objetivo verificar se houve violação da definição de *CS*, isto é:

$$\begin{aligned} \mu_{1_i}(v_i - LB_i) &= 0 \\ \mu_{2_i}(UB_i - v_i) &= 0 \end{aligned} \quad i \in I \quad (43)$$

Se alguma das multiplicações, para cada um dos fluxos reacionais, tanto no limite inferior, quanto no superior, superar a tolerância, definida em 10^{-9} (mesmo valor para violação viável máxima), então esse valor é apresentado na análise. Também são apresentados qual a reação, índice, limite inferior, fluxo primal (i.e., fluxo reacional), limite superior, valor da variável dual associada e o valor da violação.

Dessa forma é possível responder ao seguinte questionamento: Faz sentido a variável primal possuir uma variável dual associada com valor maior que zero? Se a o fluxo primal não estiver em um dos limites reacionais (inferior ou superior), logo não faz sentido que a mesma variável dual assuma valor maior que zero.

4.1.6.2.3 PPA.2: Violação da definição de CS - II

Pelo exposto em 3.1.3.2. Condições gerais de otimalidade, é notável que ou $\mu_{1_i} > 0$ ou $\mu_{2_i} > 0$. É impossível que v_i seja igual a, simultaneamente, LB_i e UB_i com $LB_i \neq UB_i$ (que não existem no modelo considerado). Sendo assim, se ocorrer de ambas as variáveis duais

associadas a v_i forem, simultaneamente, maiores que zero, então ocorreu uma violação de significado matemático.

4.1.6.2.4 PPA.3: FVA

O objetivo desse PPA é verificar se o FVA do MPCC linearizado possui correspondência com o BLPP. Isto é, se a região obtida no FVA do MPCC linearizado é igual a do BLPP. Se a mesma for igual, então existe correspondência entre ambas e a descrição matemática está acurada com o BLPP original. A correspondência foi avaliada sob a tolerância de 10^{-9} (mesmo valor para violação viável máxima).

O FVA, desse PPA, considera que ambos estão restritos à função objetivo biológica. Sendo assim, se realizou um FVA padrão para o MPCC linearizado (uma vez que o mesmo já vem implementado com a condição de otimalidade para o FBA) e um FVA com $\alpha = 1$ para o caso linearizado. Não é necessário reforçar (novamente) o FBA no MPCC linearizado. Se deseja verificar se, para algum fluxo, o mesmo falharia em obter uma solução ótima para o FBA.

Para o MPCC linearizado, somente a função objetivo é alterada para maximização e, depois, minimização do fluxo desejado. As restrições são idênticas ao apresentado no ReacKnock, ARK e ARK-Q dependendo do caso avaliado. Somente os fluxos primais foram avaliados.

Adicionalmente, haja vista que o objetivo é “observar” como os fluxos reacionais se comportam, e não decidir deleções (que já foram decididas na fase de processamento), fixaram-se as mesmas. Para fins de aceleração do *solver*, as mesmas foram tratadas como variáveis contínuas. Na prática essa mudança apenas aumenta a velocidade de processamento e não possui qualquer outro aspecto funcional.

Foram realizados dois filtros para o resultado obtido, destacando:

(*i* – Primeiro Filtro: Variáveis duais) Qualquer variável primal que possua possibilidade de variação com pelo menos uma variável dual associada aos limites reacionais maior que zero. Em outras palavras, se μ_{1i} ou μ_{2i} forem maiores que zero, então v_i deve estar fixo a um dos limites reacionais. Nesse caso, o FVA não pode fornecer outro valor viável que não o próprio v_i . Se apresentar possibilidade para tal, então os dados dessa violação são apresentados nesse

filtro. Detalhes dessa interpretação são apresentados nos resultados do Caso I. Para fins de comparação, ambos os casos, sequencial e MPCC linearizados, foram avaliados.

(ii – Segundo Filtro: Região viável) Qualquer variável primal que possua (novo) limite superior e/ou inferior diferente do caso sequencial. Os limites são estimados pelo FVA da presente seção. Se os limites forem diferentes, então, como mencionado, a região viável do MPCC linearizado e do BLPP são diferentes. Em outras palavras, o AS_{Primal} do MPCC linearizado não é o mesmo do AS_{Primal} do BLPP, configurando uma perda de correspondência substancial entre ambos.

A violação de pelo menos um dos filtros foi denotada como “perda de significado geométrico”. Isso se deve, pois, a topologia entre BLPP (caso sequencial) e MPCC linearizado (caso simultâneo) difere.

Essa análise é custosa e foi realizada somente para o melhor resultado de cada uma das nove funções objetivo industriais.

4.1.6.2.5 PPA.4: Pertinência das variáveis duais em AS dual do caso sequencial

Similar ao PPA.3, se deseja verificar se o AS_{Dual} entre o MPCC linearizado e o BLPP são iguais. Dado o custo associado a um FVA, o mesmo não foi realizado para as variáveis duais. Sendo assim outra análise foi desenvolvida.

O conjunto AS_{Dual} , como definido no Anexo D, é tal que:

$$AS_{Dual} = \left\{ \lambda, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in W \left| \begin{bmatrix} Sk \\ LB - k \\ k - UB \\ diag(y)LB - k \\ k - diag(y)UB \end{bmatrix}^t \left(\underbrace{\begin{bmatrix} \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \bar{\lambda} \\ \bar{\mu}_1 \\ \bar{\mu}_2 \\ \bar{\mu}_3 \\ \bar{\mu}_4 \end{bmatrix}}_d \right) = 0 \right. \right\} \quad (44)$$

Em que:

$$W = \left\{ \lambda \in \mathbb{R}^m; \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n \left| c + \begin{bmatrix} -S \\ -I \\ I \\ -I \\ I \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \end{bmatrix} = \mathbf{0}; \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \end{bmatrix} \geq \mathbf{0} \right. \right\} \quad (45)$$

Observa-se que a definição de conjunto de soluções viáveis duais não contempla o algoritmo do ReacKnock. Para fins de simplificação, foi considerado que $\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$, o que é

condizendo com a capacidade de transitar entre restrições de igualdade para duas de desigualdade, como ocorre no algoritmo para a restrição da matriz estequiométrica.

Note-se que a restrição de AS_{Dual} é o gradiente da função objetivo do problema dual com relação às variáveis duais. Para verificar se um conjunto de variáveis está ou não presente nesse conjunto, basta verificar se as mesmas apontam para uma direção $\mathbf{d}(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4)$ perpendicular ao gradiente da função objetivo dual.

Considerou-se que $(\bar{\boldsymbol{\lambda}}, \bar{\boldsymbol{\mu}}_1, \bar{\boldsymbol{\mu}}_2, \bar{\boldsymbol{\mu}}_3, \bar{\boldsymbol{\mu}}_4)$ é igual as variáveis duais encontradas no caso sequencial. Note-se que, mesmo que não únicas, a definição de AS (apresentada na seção 3.1.3.4. Unicidade) permite escolher qualquer $\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4 \in W$ para avaliação. Note-se ainda que as variáveis escolhidas contemplam a restrição (no caso as variáveis duais do BLPP), sendo assim, adequadas para o teste. É válido ressaltar que as variáveis duais avaliadas são a do problema interno do BLPP (FBA), e não do problema externo, a maximização da função objetivo industrial.

O valor de *gap* entre ambos foi registrado bem como uma sugestão de \mathbf{k} que fazem a direção $\mathbf{d}(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4)$ ser perpendicular ao gradiente da função objetivo dual. Note-se que para tanto se considerou $\mathbf{k} = \mathbf{1}q$, em que $q \in \mathbb{R}^1$ é uma constante chamada de Condição de Pertinência Dual (CPD).

É possível calcular CPD analiticamente por:

$$q = \frac{\Delta\boldsymbol{\mu}_2^t \mathbf{UB} - \Delta\boldsymbol{\mu}_1^t \mathbf{LB}}{\Delta\boldsymbol{\mu}_2^t \mathbf{1} - \Delta\boldsymbol{\mu}_1^t \mathbf{1} + \Delta\boldsymbol{\lambda}^t \mathbf{S1}} \quad (46)$$

Note-se que qualquer valor escolhido para \mathbf{k} respeita a dualidade forte, porém pode alterar a convergência do algoritmo Simplex. Esse, por sua vez, pode obter um outro ponto $(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4)$ diferente de quando $\mathbf{k} = \mathbf{0}$, sendo assim o novo ponto $(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4)$ não necessariamente pertence ao AS_{Dual} .

A grandeza da CPD fornece uma ideia do quão longe um ponto $(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4)$ está de fazer com que a direção \mathbf{d} seja perpendicular a função objetivo dual, e, portanto, pertencer a AS_{Dual} . Valores substancialmente grandes de \mathbf{k} não são desejáveis por facilitarem a violação da dualidade forte.

Identificar um ponto ótimo de variáveis duais que não pertence ao conjunto do caso sequencial não apresenta grande patologia. A ser discutido em mais detalhes nos resultados do Caso II, a pertinência depende de \mathbf{k} , e sempre é possível achar um compatível. Adicionalmente, as Condições KKT não versam sobre o AS_{Dual} , então a correspondência entre o MPCC linearizado e o BLPP não depende diretamente do Pertinência a AS_{Dual} .

4.1.6.2.6 PPA.5: Violação de Slater CQ

Como mencionado na seção 3.1.3.3.1., porém considerando na solução (como realizado no teorema 2.1 do estudo realizado por DEMPE e DUTTA, 2012): Considera-se que X é um conjunto aberto, em que $\{g_j | j \in J_{off}\}$ sejam pseudoconvexas em \bar{x} e $\{g_j | j \in J_{on}\}$ sejam contínuas em \bar{x} , e existe um $\bar{x} \in X$ que $g_j(\bar{x}) < 0$ para $j \in J$ (BAZARAA *et al.*, 2013 – modificado para soluções). O PPA.5 considera somente a Slater CQ em soluções, note-se ainda que a mesma pode ser interpretada como Slater CQ em AS_{Primal} (ao invés de em FS), ambos do problema interno.

É válido ressaltar que o teorema (DEMPE e DUTTA, 2012) diz que se a CQ supracitada for satisfeita em \bar{x} , então o MPCC e o BLPP possuem o mesmo resultado ótimo global (essa conclusão é a mesma fornecida pelo Teorema 2.1. do estudo citado, sendo referida dessa forma no presente manuscrito). É válido reiterar (como apresentado no Anexo A) que a Slater CQ, em programação linear, não possui o mesmo significado que nos demais casos. Isso se deve pois a mesmas nunca é necessária para dualidade forte ser válida.

Dado que o estudo de referência não faz menção a LP, se torna válido estudar tal condição no presente manuscrito. Ocorre que a Slater CQ, para soluções, possui alguns detalhes em otimizações cujo resultado é fraco (mesmo em casos não lineares).

A ocorrência de $g_j(\bar{x}) = 0$ pode não implicar na violação de Slater CQ. Isso porque pode existir um $x \in AS_{Primal}$ que seja tal que $g_j(x) < 0$. Obviamente isso se trata de uma consequência do máximo ser fraco. Para uma avaliação coerente é necessário avaliar se, na solução primal, a mesma está em um dos limites reacionais, isto é, se $\bar{v}_i = LB_i$ ou $\bar{v}_i = UB_i$ (i.e., estão em uma “extremidade”). Caso seja verdade, é necessário realizar um FVA somente na i -ésima reação, caso seja verificado que a mesma está fixa em uma dessas extremidades, então a Slater CQ não foi respeitada.

É comum encontrar fluxos bloqueados, isto é, fixos em uma extremidade com valor nulo. Essas variáveis poderiam ser removidas do problema sem afetar a solução ótima, portanto, são desconsideradas.

Note-se que é possível realizar a mesma análise pela interpretação geométrica da CS e fazer essa triagem somente em variáveis que estão em extremidades e possuem μ_{1_i} ou μ_{2_i} maiores que zero. No entanto, haja vista que o objetivo dos PPAs é, justamente, avaliar se as

variáveis duais estão de fato se comportando como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, não é possível partir do princípio que o significado físico é preservado.

É válido adicionar que o FVA das reações desejadas foi calculado novamente nesse PPA, preservando a característica que cada um deles é independente.

É esperado que, como mencionado no Anexo A, os problemas a serem apresentados não contemplariam a Slater CQ. O objetivo desse PPA não é atestar que não houve violação, mas sim quais reações violaram e qual o valor numérico de suas variáveis duais associadas. Somente as variáveis primais do caso simultâneo foram avaliadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.1 Caso I

Os resultados do presente caso têm como objetivo apresentar uma interpretação geométrica do que é discutido no Caso II. Os resultados tiveram influência direta na concepção de alguns PPA, que são retomados nesse estudo de caso.

5.1.1.1 Contextualização com viés biológico

Conforme apresentado na Figura 4, existem 3 reações. Essas reações compõem a matriz estequiométrica:

(i – v_1) a primeira delas, irreversível, entra no volume de controle (chamado de “A”). Essa reação pode ser interpretada como assimilação de substrato, por exemplo, glicose.

(ii – v_2) A segunda, reversível, sai ou entra no volume de controle. Essa reação pode ser interpretada como um subproduto do metabolismo em que a oxidação do substrato foi parcialmente atingida. Produtos como esse podem vir a ser assimilados novamente e oxidados completamente. Por exemplo, é comum que produtos da fermentação sejam álcoois (e.g., etanol) e ácidos orgânicos (e.g., ácido lático e ácido acético), que podem ser assimilados novamente e oxidados a dióxido de carbono. No presente manuscrito v_2 pode ser interpretado como etanol.

(iii – v_3) A terceira, e última reação, irreversível, sai do volume de controle. Pode ser interpretada como produto da oxidação total do substrato. Esse metabólito, para alguns microrganismos, pode não ser assimilado novamente. Um exemplo disso é o dióxido de carbono.

Os limites reacionais foram escolhidos respeitando a reversibilidade, porém seu valor numérico foi escolhido apenas para fins de facilitar a leitura de escala na visualização gráfica.

As funções objetivo, dependendo do parâmetro escolhido, variam entre maximizar v_2 e v_3 . Da perspectiva proposta aqui, é possível afirmar que a primeira visa maximizar o produto

com energia química remanescente, enquanto o segundo visa maximizar o produto sem energia química remanescente. Cada um dos casos possui consequências diretas na qualidade do resultado de otimização (e.g., forte ou fraco).

5.1.1.2 Resultado: Maximização de dióxido de carbono

Considerando a FS , já apresentada na metodologia, tem-se:

$$FS = \left\{ v \in \mathbb{R}^3 \mid \underbrace{[1 \quad -1 \quad -1]}_s v = 0, \begin{bmatrix} 0 \\ -2 \\ 0 \end{bmatrix} \leq v \leq \begin{bmatrix} 2 \\ 2 \\ 2 \end{bmatrix} \right\} \quad (47)$$

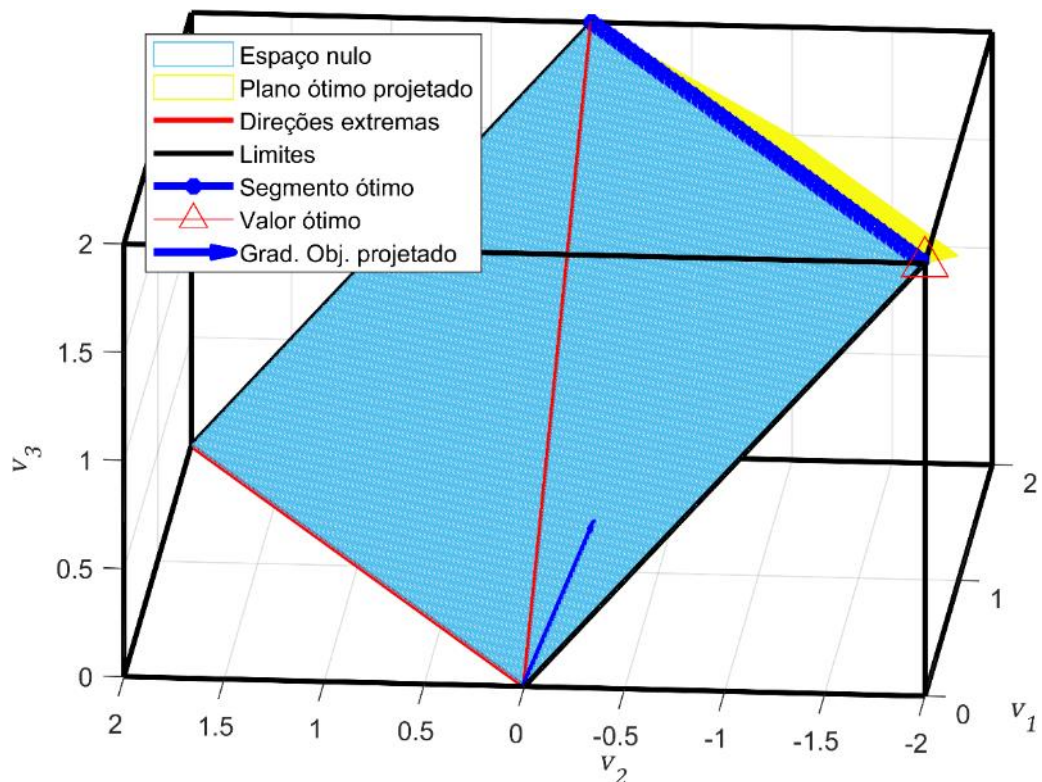
O problema de otimização sugerido inicialmente é similar à formulação do FBA:

$$\begin{array}{ll} \max_v & f(v) = [0 \quad 0 \quad 1]v \\ \text{s. t.} & v \in FS \end{array} \quad (48)$$

Reitera-se que a função objetivo escolhida, para este caso, foi $c(a = 1)$.

Como resultado, foi possível obter a seguinte figura:

Figura 5 – Gráfico Caso I para maximização de dióxido de carbono



Fonte: Autor

Como análise de pós-processamento, foram obtidos os multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Os mesmos, junto com as variáveis primais (\mathbf{v}), estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados Caso I para maximização de dióxido de carbono

Primal	$\mathbf{c}^t(1) = [0 \ 0 \ 1]$
$f(\bar{\mathbf{v}})$	2
$\bar{\mathbf{v}}^t$	[0 -2 2]
$(\bar{\mathbf{v}} - \mathbf{LB})^t$	[0 0 2]
$(\mathbf{UB} - \bar{\mathbf{v}})^t$	[2 4 0]
Dual	
λ	0
$\bar{\mu}_1^t$	[0 0 0]
$\bar{\mu}_2^t$	[0 0 1]

É visivelmente possível assegurar que, na Figura 5, existe um segmento de reta que caracteriza o AS_{Primal} da condição estudada. Isto é, esse segmento, destacado por hexágonos azuis, apresenta todos os valores de \mathbf{v} , dentro da viabilidade primal, capazes de obter uma função objetivo em seu valor ótimo. Por conseguinte, é possível atestar que o ótimo obtido é fraco.

Matematicamente, tem-se que o conjunto de soluções alternativas ótimo é tal que:

$$AS_{Primal} = \left\{ \mathbf{v} \in FS \left| \begin{array}{l} [0] \\ [0] \\ [1] \end{array} \right|^t (\mathbf{v} - \bar{\mathbf{v}}) = 0 \right\} \quad (49)$$

Observa-se, pelo Teorema do Núcleo e da Imagem (ROMAN *et al.*, 2005), que o espaço nulo do gradiente da função objetivo é da ordem de $n - 1$ (nesse caso, $n = 3$). Isso quer dizer que, no máximo, AS_{Primal} possui 2 graus de liberdade. Esse “máximo” pode ser alterado pela avaliação dos multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker.

Note-se, a priori da análise, que FS constitui um conjunto de restrições que pode ser qualificado pela LICQ: a matriz estequiométrica é um vetor, logo não é deficiente. As inequações admitem somente uma única ativa por reação, logo, também é impossível que exista deficiência no gradiente da matriz de restrições de desigualdade ativas. Sendo assim, como apresentado na seção 3.1.3.3.2, os multiplicadores são únicos (i.e., AS_{Dual} é um *singleton*).

Dessa forma, diferente do que ocorre ordinariamente em biologia de sistemas, em que a MFCQ e a LICQ não são contempladas, é possível analisar os valores numéricos dos multiplicadores diretamente e garantir que possuem total correspondência com as variáveis

duais (i.e., as variáveis duais possuem o mesmo significado matemático que os multiplicadores).

É possível verificar que $\bar{\mu}_{1,2}$ e $\bar{\mu}_{2,2}$ são zero, portanto, pela *CS*, isso permite que v_1 e v_2 variem. Isso se deve, pois, tomando o limite inferior da primeira reação como exemplo: $\bar{\mu}_{1,1}(v_1 - LB_1) = 0$. Sendo assim, o segundo termo $(v_1 - LB_1)$, dentro da viabilidade primal, pode variar livremente, uma vez que $\bar{\mu}_{1,1} = 0$. Por outro lado, $\bar{\mu}_{2,3} > 0$, sendo assim, a *CS* dessa reação é tal que $\bar{\mu}_{2,3}(UB_3 - v_3) = 0$. Dessa forma, se v_3 assumir qualquer valor diferente de UB_3 , a *CS* é desrespeitada. Sendo assim, v_3 está fixo em UB_3 .

Essa análise pode ser conduzida sem nenhum cuidado adicional, haja vista que, como o problema primal contempla a LICQ, as variáveis duais são únicas. Na maior parte dos problemas de biologia de sistemas isso não ocorre, dessa forma μ_i pode possuir valores iguais ou maiores que zero, mesmo na otimalidade, pois o ótimo dual também é degenerado. No entanto, se no resultado ótimo do problema, for possível constatar que $\mu_i > 0$, então o v_i correspondente deve estar fixo. Se isso não acontecer, claramente existe uma violação da *CS*. A análise supracitada é o fundamento do PPA.3, em que para um dado $\mu_i > 0$, o fluxo primal deve estar fixo na extremidade correspondente. No entanto, não se pode afirmar que, dentro da degeneração do ótimo dual, se for possível assumir $\mu_i = 0$, não é possível afirmar que o mesmo fluxo reacional associado permanece fixo. Resultados a serem apresentados no Caso II levam a acreditar que, se $\mu_i > 0$, então obrigatoriamente a variável primal associada é fixa.

Continuando a análise, foi mencionado que, pelo Teorema do Núcleo e da Imagem, tem-se que, no mínimo AS_{Primal} possui dois graus de liberdade. Como mencionado, se $\mu_i > 0$, então o fluxo correspondente v_i é fixo. Dessa forma, isso é impactado na dimensão do AS_{Primal} , impedindo que as variáveis de otimização variem em uma dimensão, nesse caso, v_3 é impedido. Pela análise desenvolvida até aqui, AS_{Primal} possui um grau de liberdade, perdendo mais um grau de liberdade pela quantidade de $\mu_i > 0$.

Dessa forma, AS_{Primal} possui dimensão de uma reta, é sabido ainda que v_3 é fixo em UB_3 e que v_1 e v_2 não são fixos. Por inspeção visual, é possível verificar que acontece exatamente isso na Figura 5. O segmento de reta de AS_{Primal} está fixo em $v_3 = UB_3 = 2$, v_1 e v_2 são autorizados a variar, e o resultado ótimo é preservado nessa região.

Do ponto de vista biológico, AS_{Primal} define a proporção ótima dos fluxos assimilados de glicose e etanol para a manter a otimalidade da produção de dióxido de carbono.

O problema dual (genérico), apresentado na seção 3.1.3.6.2, é tal que:

$$\begin{aligned}
& \max_{\lambda, \mu_1, \mu_2} && -c^t k + \begin{bmatrix} \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} S \cdot k \\ LB - k \\ k - UB \end{bmatrix} \\
& \text{s. t.} && -c + S^t \lambda - \mu_1 + \mu_2 = \mathbf{0} \\
& && \mu_1, \mu_2 \geq \mathbf{0} \\
& && \lambda \in \mathbb{R}^m \\
& && \mu_1, \mu_2 \in \mathbb{R}^n
\end{aligned} \tag{50}$$

Observa-se que S^t , por outro lado, é linearmente deficiente, não qualificando o problema nem pela LICQ, nem pela MFCQ. Essa última não é garantida haja vista que μ_1 e μ_2 são ativos, pelo mesmo índice de reação associada, no presente caso. É possível conferir o supracitado nas duas últimas da Tabela 2 (i.e., ambas $\mu_{1,2}$ e $\mu_{2,2}$ são iguais a zero, logo as restrições de ambas são ativas, e por conseguinte, desqualificam o problema pela MFCQ). Como consequência o problema primal (dual do dual retorna ao primal, propriedade que ocorre em LP, mencionada na seção 3.1.3.6.2. e provada no Anexo B) possui um conjunto de variáveis ótimo não único e ilimitado. É possível verificar (Anexo B) que o problema primal é de fato não único, e salvo pelas restrições referentes aos limites reacionais, o problema seria ilimitado.

Sobre o PPA.5. Violação de Slater CQ, note-se que, para o problema primal, a solução é básica (consequência do algoritmo Simplex). Note-se ainda que v_3 é fixo em LB_3 (como mencionado anteriormente), porém v_1 e v_2 apesar de iguais a UB_1 e UB_2 , não estão fixos. Esses últimos podem variar ao longo do segmento de reta AS_{Primal} (representado em azul escuro). Enquanto v_3 desrespeita a Slater CQ (em soluções), v_1 e v_2 respeitam, podendo variar dentro de AS_{Primal} . Observa-se pelo exposto que a Slater CQ, em soluções, nada mais é do que a própria Slater CQ avaliada em AS_{Primal} e não em FS .

Nessa condição o etanol também age como substrato, tornando-se um problema que permite vislumbrar qual a melhor combinação de ambos. Uma consequência disso é justamente o AS_{Primal} possuir um grau de liberdade. Ainda sob a óptica das CQ, se LB_3 fosse aumentado arbitrariamente \bar{v}_3 também aumentaria arbitrariamente. Logo, não importa o quão grande LB_3 seja (desde que finito), $\bar{v}_3 = LB_3$ e $\bar{\mu}_{2,3} > 0$. Esse exemplo ilustra o mencionado no Anexo D sobre o OptKnock manipular os limites reacionais a fim de manipular as variáveis duais. Dado que o problema dual não é qualificado pela MFCQ, é previsível observar variáveis ilimitadas. Logo, não é difícil afirmar que é possível manipular todas as variáveis duais com os limites reacionais e, ao mesmo tempo, preserva o seu significado biológico. Mudanças pequenas podem alterar o viés biológico inicialmente proposto. Em problemas em que as variáveis duais não são únicas, é ainda mais difícil prever como uma mudança nos limites reacionais pode impactar as mesmas.

Como mencionado, o ótimo encontrado é fraco, e, portanto, é encontrada degeneração na resposta do LP que é explorada nos CSOM. Note-se que, caso se desejasse maximizar a produção de etanol restrito a maximização de dióxido de carbono (objetivos com competição direta, como biomassa e uma função objetivo industrial), o resultado seria zero (por inspeção gráfica). É nesse quesito que os algoritmos CSOM entram, supondo que seja conhecido o GEM do volume de controle “A” (não apresentado), seria possível aplicar um algoritmo do tipo CSOM-MP-K (e.g., ARK). Esse algoritmo, tal como faz com função objetivo biológica e industrial, iria redirecionar o fluxo de carbono de v_3 (dióxido de carbono, representando a função objetivo biológica) para v_2 (etanol, representando a função objetivo industrial). A tendência seria observar que, com o aumento de deleções permitidas, o valor de \bar{v}_3 diminuiria e o \bar{v}_2 aumentaria.

É possível observar o descrito na Figura 5. O espaço FS é representado pelo plano azul claro, em que o plano representa uma parte da matriz estequiométrica e os segmentos de linha pretos representam os limites reacionais. O segmento de reta das soluções alternativa (AS_{Primal}) é representado por um conjunto de hexágonos azuis escuros. Ao se realizar deleções, o plano azul permanece inalterado, enquanto alguns dos limites reacionais das reações internas (não apresentado no gráfico) são fixos em zero. Dessa forma, seria possível visualizar o segmento de reta AS_{Primal} “deslizando” sobre o plano da matriz estequiométrica. Conforme ele “desliza” (com o aumento de deleções), seria possível verificar que \bar{v}_3 diminuiria e \bar{v}_2 aumentaria.

5.1.1.3 Resultado: Maximização de etanol

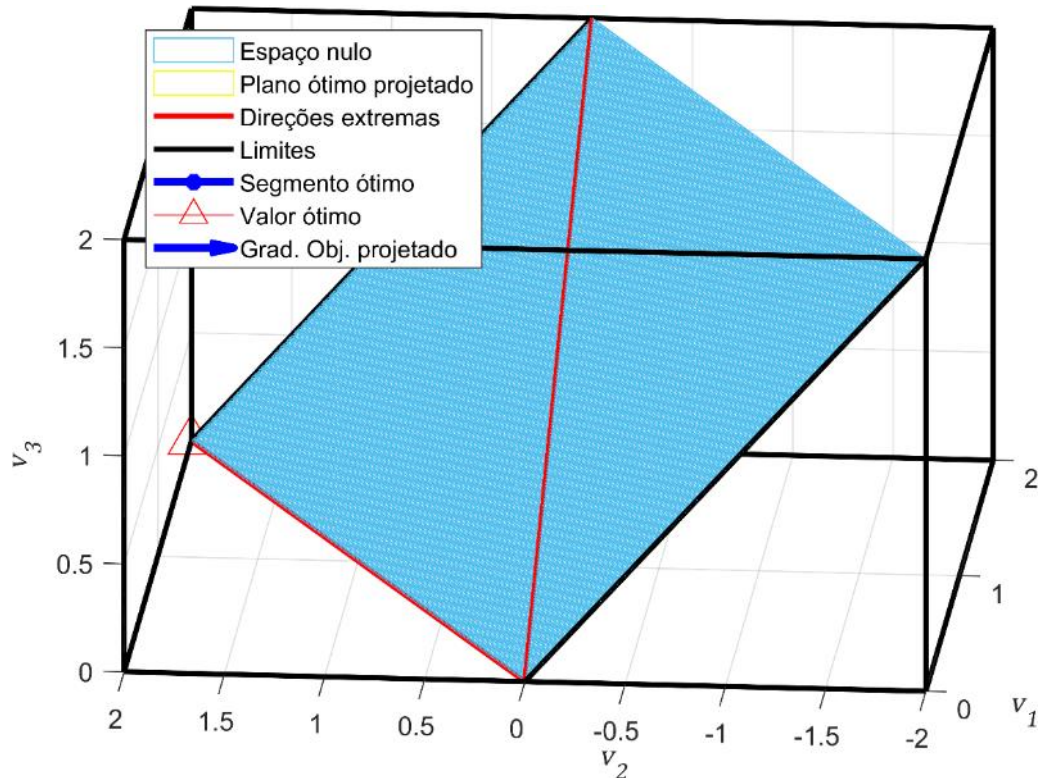
Considerando o mesmo conjunto de soluções viáveis FS , tem-se que o LP solucionado é tal que:

$$\begin{array}{ll} \max_{\mathbf{v}} & f(\mathbf{v}) = [0 \quad 1 \quad 0]\mathbf{v} \\ \text{s. t.} & \mathbf{v} \in FS \end{array} \quad (51)$$

Reitera-se que a função objetivo escolhida, para esse caso, foi $c(a = 2)$.

A Figura 6 apresenta, graficamente, o resultado do LP:

Figura 6 – Gráfico Caso I para a maximização de etanol



Fonte: Autor

Como análise de pós-processamento, foram obtidos os multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Os mesmos, junto com as variáveis primais (\mathbf{v}), estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados Caso I para a maximização de etanol

Primal	$\mathbf{c}^t(2) = [0 \quad 1 \quad 0]$
$f(\bar{\mathbf{v}})$	2
$\bar{\mathbf{v}}^t$	$[2 \quad 2 \quad 0]$
$(\bar{\mathbf{v}} - \mathbf{LB})^t$	$[2 \quad 4 \quad 0]$
$(\mathbf{UB} - \bar{\mathbf{v}})^t$	$[0 \quad 0 \quad 2]$
Dual	
λ	1
$\bar{\mu}_1^t$	$[0 \quad 0 \quad 1]$
$\bar{\mu}_2^t$	$[1 \quad 0 \quad 0]$

Diferente da condição anterior, é possível verificar por inspeção gráfica, que o AS_{Primal} da Figura 6 se resume a um ponto. Matematicamente, tem-se que o conjunto de soluções alternativas ótimo é tal que:

$$AS_{Primal} = \left\{ \mathbf{v} \in FS \left| \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix}^t (\mathbf{v} - \bar{\mathbf{v}}) = 0 \right. \right\} \quad (52)$$

A análise sobre os graus de liberdade de AS_{Primal} ocorre de maneira similar ao apresentado na seção anterior, sendo assim, no máximo, AS_{Primal} dois graus de liberdade. Ocorre que, nessa condição, AS_{Primal} é um *singleton*, tal como AS_{Dual} . Como já apresentado na condição anterior (para essa última), o problema primal é qualificado pela LICQ, o que obriga o AS_{Dual} ser um *singleton* (i.e., ótimo forte, um único ponto).

Note-se que existem duas variáveis duais maiores do que zero, μ_{1_3} e μ_{2_1} . Diferente da condição anterior, em que havia somente uma, neste caso AS_{Primal} perde dois graus de liberdade e se torna um *singleton*. Note-se ainda que μ_{1_2} e μ_{2_2} são nulos, o que, segundo a análise de *CS*, permite que v_2 varie. Ocorre que, devido a topologia da matriz estequiométrica e dos limites reacionais, não existe horizonte de variação possível. Esse resultado é perceptível por $\lambda \neq 0$, que, em outras palavras, indica que a mudança da matriz estequiométrica pode retornar uma melhora da função objetivo, o que é perceptível nesse caso (i.e., análise de *shadow price*, não abordada no manuscrito).

Ao contrário do caso anterior, em que $\lambda = 0$, apenas a mudança dos limites reacionais do caso atual (pelas variáveis duais μ_{1_3} , μ_{2_1} e μ_{2_2} serem maiores do que zero) permite a função objetivo obter melhores valores.

Apesar do problema primal ser único, o problema dual não satisfaz a LICQ, isso é perceptível pois ambas as restrições de desigualdade de μ_{1_2} e μ_{2_2} são ativas. Dessa forma, ambas as qualificações LICQ e MFCQ não são satisfeitas, no entanto, ainda assim, a solução do problema primal é única. Como mencionado, a LICQ é uma condição suficiente, porém não necessária para uma solução ser única.

Adicionalmente, se o vetor de otimização fosse perturbado (e.g., somar e subtrair um δ em qualquer elemento do vetor objetivo), isso não afetaria os graus de liberdade (pelo Teorema do Núcleo e da Imagem) de AS_{Primal} , o problema dual ainda não contemplaria LICQ e MFCQ e o problema primal obteria resultado não único (como esperado). Em outras palavras, alterar a inclinação do gradiente da função objetivo alteraria a solução ótima de forte para fraca.

É possível verificar que variáveis duais tais que $\mu = 0$ não garantem que a variável primal associada seja fixa ou não. Situações similares podem ocorrer em GEM, em que, diferente do presente caso, as variáveis duais são não únicas. É notável ainda que, na otimalidade de um MPCC linearizado, $\mu = 0$ porém o mesmo pode assumir um valor maior

que zero devido a não unicidade. Enquanto para $\mu = 0$ não é possível concluir se o fluxo reacional associado é fixo ou não, quando $\mu > 0$ (como apresentado na seção anterior), garante-se que o fluxo primal é fixo.

Do ponto de vista biológico, o ótimo forte pode ser interpretado como a ausência de opções de substrato (somente glicose) e da produção de produtos indesejados (nesse caso o dióxido de carbono). Sendo assim, para se atingir o ótimo desejado, necessariamente se consome toda a glicose possível e não se produz nenhum dióxido de carbono. Na vida real isso é impossível, não considerado no modelo, mas a fisiologia celular demanda oxidação do substrato para processos de manutenção e formação de biomassa. Este exemplo reitera que abordagens de fluxômica garantem o melhor resultado fisicamente possível, o que, não necessariamente, é biologicamente possível.

A Slater CQ, em resultados, não é verificada em ambos os problemas primal e dual, uma vez que possuem solução ótima forte. Pelo exposto no Teorema 2.1 do estudo de DEMPE e DUTTA, 2012, essa condição pode representar um problema para correspondência entre MPCC linearizado e o BLPP. Tal como a condição da seção anterior, é inusitado, um problema “bem-comportado” apresentar tal disfuncionalidade. Vale ressaltar que em problemas GEM ocorrem as três possibilidades para diversas reações: (i – restrição passiva) reações possuem intervalo viável diferente de zero com $\mu = 0$. (ii – restrição ativa) Reações com intervalo viável igual a zero com $\mu = 0$. (iii – restrição fortemente ativa) Reações com intervalo igual a zero com $\mu > 0$.

Em maiores detalhes, a seção 5.1.2.4.4. ilustra como a Slater CQ em resultados (na presente aplicação) está relacionado com o Teorema 2.1. Em outras palavras, a violação da Slater CQ em resultados é condição suficiente, e, não necessariamente, todas as reações que violam a mesma perdem significado geométrico. Isto é, nem todas as reações têm seus limites viáveis alterados (entre o problema interno e externo) para aumentar (de forma irreal), a função objetivo do problema externo.

No presente caso a unicidade do problema primal é um caso isolado devido ao pequeno número de variáveis. Note-se que transformar o fluxo reacional v_2 (reversível) em duas outras novas reações tais que $v_2 = v_2^+ - v_2^-$, em que ambas são maiores ou iguais a zero, resultaria em um resultado não único. Isso se deve pois existem infinitos valores reais de v_2^+ e v_2^- que satisfazem $v_2^+ - v_2^- = 2$.

Mesmo com resultado único, é possível realizar a mesma análise da condição anterior. Para CSOM-MP-K, a unicidade não é um fator determinante para impedir que algoritmos, como

ARK, investiguem a região viável de AS_{Primal} . Isto é, para a maximização de dióxido de carbono (seção anterior), AS_{Primal} , restrição correspondente ao FBA, tem dimensão de uma reta. Em outras palavras, após a maximização da biomassa (i.e., FBA, e problema interno de ARK, função objetivo industrial), existe um horizonte possível a se explorar (AS_{Primal}) e, no caso anterior, poderia ser o etanol (função objetivo industrial). No presente caso, significa que essa investigação é redundante, haja vista que AS_{Primal} é um *singleton*, então o resultado do problema interno é o mesmo do externo. No entanto, isso não quer dizer que, com deleções, o resultado do FBA permaneça sendo forte. Por inspeção visual é fácil perceber que, para um $c^t(2)v < 2$ haveria uma distância entre o novo ótimo e o ponto extremo (antigo ótimo), resultando em um pequeno segmento de reta, fazendo com que AS_{Primal} possua um grau de liberdade.

Note-se que problemas (internos) com resultado ótimo forte tornam a maximização da função objetivo industrial redundante. No entanto não é incomum que metodologias que tentem obrigar o resultado de um FBA a ser único, um exemplo é a *Lexicographic Optimization* (GOMEZ *et al.*, 2014), um *multiplex* (não abordado no presente manuscrito). Em outras palavras maximizam-se reações e essas são reintroduzidas no modelo como restrições sequencialmente, até que AS_{Primal} se torne um *singleton*. Outra opção é adicionar um agente perturbador quadrático, suficientemente pequeno, na função objetivo biológica a fim de tornar o resultado ótimo forte por condições de otimalidade de segunda ordem (não apresentado) (PLOCH *et al.*, 2020). Essa segunda é menos custosa que um algoritmo do tipo anteriormente citado e que mimetiza um pFBA, em que se deseja minimizar o uso de enzimas. Observa-se que, por mais que a ideia seja mimetizar um pFBA, a estratégia quadrática garante um ótimo forte, o pFBA não necessariamente.

Caso uma das estratégias seja tomada, como hipótese simplificadora, é notório que o valor máximo da função objetivo industrial pode ser afetado negativamente. Desse modo a combinação de deleções pode ser afetada de modo que o resultado da função objetivo industrial seja menor do que sem essa hipótese. É razoável assumir, dessa forma, que forçar uma solução ótima primal pode afetar, negativamente, o resultado de um CSOM-MP-K. Por esse motivo o algoritmo ARK-Q possui a diagonal principal, para as variáveis primais, de Q nula (seção 4.1.5.2.5.).

5.1.1.4 Conclusões: Caso I

Ambos os casos apresentam, isoladamente, situações ordinárias em GEM. Foram apresentadas representações gráficas dessas acompanhadas de uma discussão sobre, principalmente: (i) a relação dos resultados com a teoria da dualidade. (ii) A dimensão de AS_{Primal} e como essa se relaciona com a teoria da dualidade. (iii) Como a Slater CQ pode ou não ser observada na solução ótima do problema interno, e, por conseguinte, no AS_{Primal} . (iv) Uma interpretação geométrica dos algoritmos CSOM, também sob a perspectiva biológica. (v) Por fim, foram apresentadas algumas motivações para os PPAs e o delineamento experimental.

5.1.2 Caso II

O principal objetivo da parte de processamento foi obter dados para fins de comparação com a literatura, e, posteriormente, com formulações sugeridas. Para o primeiro caso, foi implementado o algoritmo ReacKnock, em que foi possível comparar os resultados obtidos com o artigo original, XU *et al.*, 2013. Em adição aos demais (ARK e ARK-Q), foram sugeridas melhorias no algoritmo, procurou-se comparar o tempo computacional, variáveis de otimização (primais e duais), os valores de função objetivo, alvos de deleção bem como, por último, mas mais importante, a otimalidade do problema interno (FBA). Nessa parte espera-se que os resultados de ReacKnock, ARK e ARK-Q, fossem virtualmente iguais.

Na fase de pós-processamento, o principal objetivo foi verificar o elo entre BLPP e como o mesmo é representado, no caso, por um MPCC linearizado. Para tanto se destrinchou a otimalidade do problema interno. Foi possível questionar se houve violações, e se ocorreram, em quais reações, como as variáveis duais se comportaram e a magnitude da violação (quando aplicável). Para tanto foram usados os algoritmos PPA. As principais formas de “quebrar” esse elo foram denominadas de perda de (i) significado matemático e (ii) significado geométrico. A primeira diz que a otimalidade do problema interno foi desrespeitada. Enquanto a segunda diz que a topologia do conjunto alternativo primal (AS_{Primal}) é diferente entre o problema interno do BLPP e o MPCC linearizado.

Após o pré-processamento, o GEM *iAF1260* contou com 1532 reações e 1032 metabólitos. Os limites reacionais foram definidos conforma a seção 4.1.4. Pré-processamento.

Todos os algoritmos implementados (ReacKnock, ARK e ARK-Q), foram avaliadas para 9 funções objetivo industriais diferentes: succinato, etanol, acetato, (próton) hidrogênio, formiato, glicolato, D-lactato, fumarato e treonina.

Dessa forma, cada algoritmo contou com uma rodada de otimização para cada uma das 9 funções objetivo industriais, totalizando 27 rodadas ao todo. Para cada uma dessas rodadas foi realizado os 5 PPA mencionados na seção 4.1.6. Pós-processamento.

5.1.2.1 Resultados: ReacKnock

5.1.2.1.1 Processamento: ReacKnock

O algoritmo ReacKnock foi implementado visando a maior fidelidade possível com o algoritmo originalmente sugerido por XU *et al.*, 2013. A formulação matemática é rerepresentada a seguir:

$$\begin{aligned}
 & \min \\
 & \mathbf{v}, \lambda_1, \lambda_2, \\
 & \mu_1, \mu_2, \mu_3, \\
 & \mu_4, \mathbf{y} \\
 & -\mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
 & \text{s. t.} \\
 & \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & -\mathbf{1} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{1} \\ S & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ -S & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ -I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ -I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \text{diag}(LB) \\ I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & -\text{diag}(UB) \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & \mathbf{0} & \mathbf{0} & M \cdot I \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & I & M \cdot I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} \leq \begin{bmatrix} n-K \\ K-n \\ \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \\ -LB \\ UB \\ \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \\ M \\ M \end{bmatrix} \\
 & \begin{bmatrix} \mathbf{0} & S^t & -S^t & -I & I & I & -I & \mathbf{0} \\ -\mathbf{c}^t & -(Sk)^t & (Sk)^t & (k-LB)^t & (UB-k)^t & k^t & -k^t & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & NK \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{c} \\ -\mathbf{c}^t k \\ \mathbf{1} \end{bmatrix} \\
 & \lambda_1, \lambda_2, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \geq \mathbf{0} \\
 & \mathbf{v}, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n \\
 & \lambda_1, \lambda_2 \in \mathbb{R}^m \\
 & \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
 \end{aligned} \tag{53}$$

O problema, para cada uma das 9 rodadas estudadas, possui 11256 variáveis, em que 1532 variáveis são binárias, muito embora 103 possuam valor fixo (e para fins de performance, convertidas em contínuas) por serem reações artificiais. Neste algoritmo existem duas variáveis duais linearmente dependentes, λ_1, λ_2 originadas de $Sv \leq 0$ e $-Sv \leq 0$. Essa representação da matriz estequiométrica aumenta o número de variáveis do problema em 1032 (i.e., número de linhas de uma das restrições). Em outras palavras, $\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$, em que λ é a variável dual associada a $Sv = 0$. Existem ainda 12894 restrições (ao todo), em que, da mesma forma que poderiam ser evitadas 1032 variáveis, poderiam ser evitadas 1032 restrições advindas da mesma fonte. Esse tipo de mecanismo ocorre devido à teoria da dualidade, em que a variável dual está sempre atrelada à restrição primal e vice-versa para o caso linear.

Observa-se que as variáveis com informações de cunho biológico correspondem às 1532 (das 11256 estimadas) que representam os fluxos metabólicos do microrganismo estudado. Exceto pelas variáveis binárias, que representam a existência ou não de deleções, as variáveis duais, nesse caso, não são importantes para a etapa de processamento. Note-se ainda que, como apresentado em 4.1.6.2.1. Tabela resumo, é possível verificar a correspondência do problema interno sem a necessidade de se avaliar as variáveis duais (i.e., usando o caso sequencial e comparando com o caso simultâneo). O estudo das variáveis duais na otimalidade, e, portanto, da correspondência com os multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, reside justamente nos PPA, que são inéditos para algoritmos CSOM.

A Tabela 4 é um excerto da Tabela resumo e apresenta os resultados do ReacKnock, comparando ambas as versões. Informações adicionais (e.g., parâmetros de otimização e soluções adicionais) podem ser encontradas no arquivo suplementar “SF_Table_4.xlsx” (Tabela resumo completa).

Tabela 4 – Resultados: ReacKnock

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
Succinato	XU <i>et al.</i>	9,96	0,1173	66,7%	ACtex; ATPS4rpp; CO2tex; PGL; THD2pp.	Sim
Succinato	Trabalho atual	9,96	0,1173	66,8%	ACtex; ATPS4rpp; CO2tpp; PGL; THD2pp.	Sim
Etanol	XU <i>et al.</i>	18,5	0,104	99,7%	ATPS4rpp; FORtex;	Sim

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
					GLUDy; O2tex; THD2pp.	
Etanol	Trabalho atual	18,5	0,104	99,5%	ATPS4rpp; FORtppi; GLUDy; O2tex; THD2pp.	Sim
Acetato	XU <i>et al.</i>	22,7	0,145	88,4%	CO2tex; F6PA; GLCDpp; PFK; PGL.	Sim
Acetato	Trabalho atual	23,53	0,106	91,6%	ATPS4rpp; EDD; GLUDy; PSERT; TPI.	Sim
Hidrogênio	XU <i>et al.</i>	66,65	0,119	87,0%	ETOHt2rpp; G6PDH2r; H2Otp; PGM; TKT2.	Sim
Hidrogênio	Trabalho atual	66,65	0,119	87,0%	ETOHtex; H2Otp; PGL; PGM; TKT2.	Sim
Formiato	XU <i>et al.</i>	32,08	0,127	73,4%	ACALD; EDD; ENO; H2Otex; PPS.	Sim
Formiato	Trabalho atual	32,08	0,127	73,4%	ACALD; G6PDH2r; H2Otex; PGM; PPS.	Sim
Glicolato	XU <i>et al.</i>	18,27	0,129	71,1%	ACtex; AKGDH; ATPS4rpp; MALS; PGCD.	Sim
Glicolato	Trabalho atual	22,72	0,146	88,4%	CO2tex; F6PA; G6PDH2r; GLCDpp; PFK.	Sim
D-Lactato	XU <i>et al.</i>	18,52	0,10	100%	ASNS2; ATPS4rpp; CBMKr; ETOHtex; O2tex.	Sim

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
D-Lactato	Trabalho atual	18,52	0,10	100%	ATPS4rpp; CBMKr; ETOHtex; NDPK3; O2tpp.	Sim
Fumarato	XU <i>et al.</i>	13,45	0,152	83,6%	CO2tex; CYTBO3_4pp; FORtppi; PDH; PYRtex.	Sim
Fumarato	Trabalho atual	13,45	0,152	83,6%	CO2tpp; CYTBO3_4pp; FORtppi; PDH; PYRtex.	Sim
Treonina	XU <i>et al.</i>	0	0,885	0%	ANHMK; DHORD5; GTHRDHpp; OMBZLM; VPAMT.	Sim
Treonina	Trabalho atual	0	0,885	0%	2AGPE160tipp; LPLIPAL2G161; MLDCP2Bpp; PLIPA1E160pp; PLIPA1E161pp.	Não

i – Unidades em $mmol/(gWD \cdot h)$. *ii* – Unidades em h^{-1}

A Tabela 4 apresenta os resultados da implementação do ReacKnock (chamado de Trabalho atual) e os resultados do estudo original (XU *et al.*, 2013). A terceira coluna, “Fluxo”, apresenta o valor ótimo da função objetivo industrial (i.e., função objetivo do problema externo). A quarta coluna, “Bio”, apresenta o valor ótimo da função objetivo biológica (i.e., função objetivo do FBA). A quinta coluna, “FVA (% WT)”, se trata do percentual atingido (com relação a WT) considerando o fluxo da reação objetivo do mutante. A sexta coluna, “Deleções”, apresenta os nomes das reações deletadas, que seguem o padrão, e podem ser encontradas, no *database* BiGG. A sétima (e última) coluna, “Verificações”, mostra se os resultados do problema interno e externo simultâneo coincidiram com os resultados sequenciais. Se a resposta for negativa para pelo menos um, então retorna-se “Não” como resposta.

Todos os resultados da Tabela 4 são melhores ou iguais aos do estudo original. Dessa forma, torna-se razoável dizer que a implementação foi realizada corretamente, uma vez que não foi fornecida no estudo original (XU *et al.*, 2013). Note-se, no entanto, que algumas diferenças são observáveis: (Grupo I) resultados ligeiramente diferentes (e.g., FVA (% WT) do

succinato e etanol). (Grupo II) Resultados consideravelmente melhores para a presente implementação (e.g., acetato e glicolato).

Para o primeiro caso, essas diferenças, provavelmente, se devem aos algoritmos significativos. Dado que, no artigo original, foram considerados apenas 10 minutos de simulação, é razoável propor um *preset* de parâmetros menos ambicioso quanto à violação máxima permitida. Dessa forma, caso essa violação seja muito grande (não apresentada no artigo original), é notório que não se considerem muitos algoritmos. Para o presente, a maior violação de restrições foi da ordem de 10^{-10} .

Para o segundo caso, as diferenças se devem a um resultado ótimo melhor que o do caso original. Isso se deve a uma série de motivos:

(i – Tempo de otimização) Para balancear o *preset* de parâmetros da implementação Trabalho atual, que possui uma combinação que visa a maior precisão possível, se considerou mais tempo computacional. Enquanto o caso original considera 10 minutos, o presente considera 90 minutos de tempo de otimização.

(ii – Especificações técnicas) Adicionalmente, a máquina usada para ambas as simulações foi diferente. Enquanto no caso original se trata de um servidor com número grande de *threads* e menor frequência. A implementação sugerida foi executada em um computador com menos número de *threads* e maior frequência. É difícil, se não impossível, dizer qual tempo de simulação seria equivalente entre ambas as especificações técnicas. Resultados melhores para a implementação sugerida podem ser advindos de uma maior frequência. Dessa forma, permite-se que o algoritmo caminhe mais rapidamente ao longo da BST. O próprio desenvolvedor do *software* afirma que maiores frequências são preferíveis a maior número de *threads*, haja vista que a distribuição de tarefas entre eles pode ser desigual (arquivo suplementar “SF_Gurobi_2.pdf”).

(iii – Algoritmo) O tipo de algoritmo usado para a exploração da BST, como mencionado, é heurístico. Nos últimos 9 minutos de simulação (10% do total), esse algoritmo troca a estratégia a fim de verificar resultados melhores. Como o nome já diz, “heurístico”, não necessariamente se obtenha os mesmos resultados no mesmo tempo computacional, tampouco que esses sejam ótimos globais (para as variáveis binárias, i.e., não é possível afirmar que as deleções sugeridas são as melhores possíveis).

O resultado para o glicolato endossa o quão importante é considerar algoritmos que garantam o ótimo. Embora não existam garantias que o presente seja, o resultado obtido não somente é melhor para a formação de produto (i.e., função objetivo industrial), como também é melhor para a formação de biomassa (i.e., função objetivo biológica). É válido ressaltar que

a troca do algoritmo não interfere na formulação implementada, podendo apenas alterar um parâmetro do *preset*.

Para os alvos do Grupo I (i.e., todos aqueles que não acetato e glicolato), existem poucas diferenças de reações deletadas. Exemplos comuns são reações com final “-tpp” e “-tex”, como ocorre com o D-Lactato. A reação “O2tpp” precede a reação “O2tex” em série, sem qualquer ramificação. Em outras palavras, em termos de alvos de deleção, ambos são equivalentes por interromperem o fluxo no mesmo ramo.

Essa última observação ilustra que existem resultados não únicos também para as variáveis binárias (existe mais de um \mathbf{y} que retorna o mesmo v_{obj}). Esses resultados podem ser evitados por meio de técnicas similares a LTM (Apêndice A), em que se realiza a deleção em um intermediário que é responsável pelas reações em série.

Todas as funções objetivo industriais passaram pelas verificações, exceto a treonina. Essa rodada de otimização pode ser classificada como capciosa, haja vista que o resultado esperado era de fato nulo. Ocorre que, em termos numéricos, mesmo refinando os parâmetros de precisão, pode se obter um valor não nulo maior que a tolerância. Virtualmente igual a zero ($\sim 10^{-6}$ como solução ótima vs. 10^{-9} de tolerância), mas não passando pelo critério, a treonina foi único resultado que obteve dissonância entre o caso sequencial e simultâneo.

5.1.2.1.2 Pós-Processamento: ReacKnock

Dado que a treonina não passou pelos filtros de verificação iniciais, a mesma é discutida separadamente.

Algoritmos de pós-processamento, como mencionado, são escassos na literatura de CSOM. O presente caso, que visa investigar a relação entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, é igualmente escasso. Sendo assim, os resultados são desacompanhados de comparação com o artigo original (como foi realizado na seção anterior para processamento).

O primeiro algoritmo de pós-processamento, PPA.1, encontrou 2 reações que desrespeitam a CS para o succinato e fumarato. Ambas ocorrem em uma ordem de grandeza próxima a tolerância (10^{-8} de violação vs. 10^{-9} de tolerância). Esse tipo de ocorrência reitera que um limite inferior (LB_i) e/ou um limite superior (UB_i) suficientemente grande pode tornar

a CS suficientemente suscetível a violações. Nesses casos é possível que se, por exemplo, $LB_i = 999999$ (como ocorre por padrão de notação) a variável dual associada (μ_{1_i}) assumam um valor substancialmente pequeno, mas suficientemente maior que a tolerância. Nesse caso, é possível que μ_{1_i} perca o significado matemático, e se comporte apenas como variável dual, perdendo a função de multiplicador de Kuhn-Tucker.

Nesses casos, é possível que as funções objetivo industrial e biológica do MPCC linearizado apresentem o mesmo resultado que as do caso sequencial. Muito embora, as variáveis duais do problema interno, sejam apenas valores quaisquer sem significado matemático. Essa perda de sentido matemático pode afetar o conjunto de soluções alternativas ótimas do MPCC linearizado. Em outras palavras, os fluxos viáveis, dado que a cepa atingiria um dado valor de biomassa e de produto, seriam diferentes levando, por conseguinte, a falha do PPA.3. Logo, o PPA.1. reitera a importância de aplicar algoritmos de pré-processamento, principalmente o FVA.

Note-se que, pelo supracitado, a perda de significado matemático pode implicar na perda de significado geométrico. Isto é: uma variável dual que μ_{1_i} , no caso sequencial, pode ser maior que zero. No entanto, pela perda de significado matemático, pode ocorrer que $\mu_{1_i} = 0$. Dessa forma, o fluxo primal associado, v_i , está livre para variar (perda de significado geométrico).]

Mesmo que a perda de significado matemático implique na perda de significado geométrico, não necessariamente o segundo depende do primeiro. Sendo assim, pode ocorrer perda de significado geométrico mesmo sem a perda de significado matemático.

O PPA.2. não obteve nenhum fluxo detectado. Logo, ou $\mu_{1_i} > 0$ ou $\mu_{2_i} > 0$, não houve nenhuma ocorrência em que isso fosse desrespeitado.

O PPA.3. foi realizada somente para a melhor solução ótima obtida e realizou um FVA. Como mencionado na seção 4.1.6.2.4. PPA.3: FVA, se fixou o valor de função objetivo biológica do mutante e as reações sujeitas ao algoritmo foram somente as primais (que foram maximizadas e minimizadas). Para fins de comparação, as variáveis duais associadas aos limites reacionais foram introduzidas na tabela (que se encontra como Arquivo Suplementar).

Após a aplicação de ambos os filtros (i – Variáveis Duais e ii – Região viável, mencionados na seção 4.1.6.2.4. PPA.3: FVA) não se verificou nenhuma ocorrência. Ou seja, nenhuma reação variou com uma variável dual maior que zero. A região viável de ambos, variável a variável, não variou entre o caso sequencial e o simultâneo.

Note-se que as variáveis duais do caso sequencial são diferentes do caso simultâneo (como a ser apresentado no próximo PPA). Algumas delas são passíveis de serem maiores que

zero para o caso simultâneo e zero para o caso sequencial, mesmo assim, não foram encontradas reações no PPA.3 que violassem alguns dos filtros. Em outras palavras, não se detectou perda de significado matemático ou geométrico.

O PPA.4 avaliou se a rodada estudada resultaria variáveis duais que não pertencem ao mesmo conjunto do problema solucionado sequencialmente. Em nenhuma das rodadas as variáveis duais pertenceram ao conjunto de variáveis do caso sequencial. Note-se, no entanto, a CPD foi substancialmente pequeno (da ordem de, no máximo, 10^{-1}) para todos os casos.

Adicionalmente, pelo exposto na seção 4.1.6.2.5. PPA.4, é possível verificar que existe ao menos uma CPD que pode satisfazer a condição de pertinência. Sendo assim, não importa qual o resultado das variáveis duais do MPCC linearizado, essas sempre podem pertencer ao conjunto dual do caso sequencial.

A afirmação supracitada ainda é válida mesmo que as variáveis duais percam significado matemático. Isso significa que o PPA.4 isolado é pouco informativo. Quando em ausência dos demais, é impossível dizer se as variáveis duais de fato se comportam como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Se esse significado é preservado, a magnitude da CPD diz se isso é viável ou não.

Caso a CPD seja suficientemente grande, o condicionamento da matriz de igualdade pode ser severamente prejudicado. Adicionalmente, a possibilidade de violação da dualidade forte aumenta substancialmente. Isso faz com que o elo entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker seja abalado (i.e., significado matemático). Logo, caso os PPAs anteriores não detectem anomalias, então o PPA.4 pode fornecer informações sobre a escolha de um CPD para a melhor descrição do conjunto dual.

O PPA.5. apresenta as reações que fazem a Slater CQ (na solução, no caso, do problema interno) não ser verificada. Isto é, reações que se encontram em um dos limites reacionais e não são aptas a variação por uma análise de FVA dessas reações (restrito a $\alpha = 1$). Todas as rodadas (exceto treonina, que é discutida a seguir) apresentaram reações que fizeram a Slater CQ falhar. Comumente essas reações são: ATP de manutenção ("ATPM"), assimilação de substrato ("EX_glc_e_"), formação de biomassa ("Ec_biomass_iAF1260_core_59p81M") e/ou reações da série de assimilação de gás oxigênio ("EX_o2_e_", "O2tex" e/ou "O2tpp").

É curioso verificar que, justamente nessas reações, para a maioria dos casos, as variáveis duais associadas, no caso sequencial, são nulas, enquanto, no caso simultâneo, são maiores do que zero (é possível verificar o supracitado nos resultados do PPA.3, disponível em Arquivo Suplementar).

Tomando como exemplo, o fumarato apresenta todas as reações supracitadas no PPA.5. No caso sequencial, a única variável dual não nula é a associada ao limite superior da formação de biomassa ($\mu_{2_{bio}} = 1$). Enquanto, por outro lado, no caso simultâneo, existem três reações com variáveis duais associadas não nulas: $\mu_{1_{ATPM}} = 0,0039$, $\mu_{1_{EX_glc_e_}} = 0,0148$ e $\mu_{2_{O2tpp}} \cong 10^{-4}$. Esse resultado ilustra que o conjunto alternativo dual, do problema interno (AS_{Dual}), é não único e permite essa transição de valores nulos e maiores que zero, sem afetar a topologia primal (haja vista que a PPA.3 constatou isso).

O PPA.1 e 2 verificam que a CS é respeitada elemento a elemento, o PPA.3 verifica que a região viável primal do caso sequencial e simultâneo são iguais e a restrição DF e dualidade forte obtiveram, no máximo, violação de da ordem de 10^{-10} . É razoável propor que, para o ReacKnock e as funções objetivo estudadas, as variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker mantiveram seu elo. Por tanto é igualmente razoável propor que a otimalidade do problema interno (FBA) foi verificada e, portanto, o significado matemático foi mantido.

5.1.2.1.3 Treonina

Diferente das demais rodadas, não foi possível verificar o resultado esperado para a função objetivo industrial. Isto é, o resultado do problema interno, FBA, foi verificado comparando o caso sequencial com o simultâneo. No entanto, para o problema externo, o resultado obtido foi diferente: $\sim 10^{-6}$ para o caso simultâneo e $\sim 10^{-11}$ para o caso sequencial. Ocorre que, apesar de não ser garantida a condição de ótimo global (para a BST, devido ao uso de um algoritmo heurístico), o resultado do problema externo deveria ser igual para ambos os casos sequencial e simultâneo. Portanto, o esperado era que o resultado ótimo fosse da ordem de 10^{-11} (igual ao caso sequencial), o que condiz, também, com a precisão numérica definida o *preset*.

O resultado possui uma violação máxima da ordem de 10^{-10} , respeitando assim a DF e a dualidade forte. Pelos PPA.1 e 2 é possível verificar que, para o primeiro, houve 17 violações, em que a maior é da ordem de 10^{-7} , enquanto para o segundo, não houve violações. Uma violação dessa ordem, apesar de ser retida pelo filtro (tolerância da ordem de 10^{-9}), ainda é razoável considerar que foi um problema numérico a ser desconsiderado (virtualmente zero). Considerando agora o PPA.3, foi possível verificar que não houve variação entre variáveis

primais quando a sua variável dual associada (aos limites reacionais) era maior que zero. Dessa forma, considerou-se que a *CS* foi verificada.

Ainda no PPA.3, foram detectadas 1080 ocorrências (de 3064 possíveis) de reações cujos limites reacionais diferiam do FVA sequencial com relação ao simultâneo para variáveis primais. A maior lacuna (entre o limite do caso sequencial e do caso simultâneo) de todas as ocorrências é da ordem de 10^{-6} (perda de significado geométrico).

O PPA.4 foi similar às demais rodadas, com valor de CPD da mesma ordem de grandeza.

Pelos PPAs anteriores, apesar do maior número de ocorrências, a dimensão da violação pode ser classificada como pequena o suficiente para se considerar que o problema interno foi respeitado (i.e., não houve perda de significado matemático). Sendo assim, se considerou que o elo entre variáveis duais e multiplicadores foi preservado. Contudo, outro resultado inusitado reside no número de ocorrências no PPA.5.

Obtiveram-se 81 ocorrências de reações que não respeitaram a Slater CQ (em soluções). Essas, diferente das outras rodadas, ocorreram para diversas outras reações (e.g., desde reações de transporte até biossíntese de purinas e pirimidinas).

Em outras palavras, a Slater CQ em soluções é obrigatoriamente desrespeitada se o resultado ótimo da função objetivo industrial for um de seus limites reacionais. É possível vislumbrar que, apesar de condição suficiente (e não necessária) do Teorema 2.1. (DEMPE e DUTTA, 2012), a Slater CQ pode ter um papel importante também em BLPP lineares.

5.1.2.2 Resultados: ARK

5.1.2.2.1 Processamento: ARK

Com o objetivo de mitigar possíveis problemas numéricos que possam ferir a convergência do Simplex, algumas mudanças foram sugeridas na formulação original do ReacKnock (Todas as melhorias foram discutidas previamente na seção 4.1.5.2.4. ARK):

$$\begin{aligned}
& \max_{\mathbf{v}, \lambda, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4, \mathbf{y}} \quad \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
& \text{s. t.} \quad \begin{bmatrix} -I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \text{diag}(\mathbf{LB}) & 0 \\ I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -\text{diag}(\mathbf{UB}) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & I & 0 & M \cdot I & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & I & M \cdot I & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} \leq \begin{bmatrix} -\mathbf{LB} \\ \mathbf{UB} \\ 0 \\ 0 \\ M \\ M \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} (C.I.1) \\ (C.I.2) \\ (C.I.3) \\ (C.I.4) \\ (C.I.5) \\ (C.I.6) \end{array} \\
& \begin{bmatrix} 0 & \mathbf{S}^t & -I & I & -I & I & 0 \\ -\mathbf{c}^t & -(\mathbf{S}\mathbf{k})^t & (\mathbf{k} - \mathbf{LB})^t & (\mathbf{UB} - \mathbf{k})^t & \mathbf{k}^t & -\mathbf{k}^t & 0 \\ \mathbf{S} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \mathbf{NK} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{v} \\ \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ \mathbf{y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{c} \\ -\mathbf{c}^t \mathbf{k} \\ 0 \\ n - K \\ 1 \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} (C.E.1) \\ (C.E.2) \\ (C.E.3) \\ (C.E.4) \\ (C.E.5) \end{array} \\
& \begin{aligned} & -M \leq \lambda \leq M \\ & 0 \leq \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \leq M \\ & \mathbf{v}, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n \\ & \lambda \in \mathbb{R}^m \\ & \mathbf{y} \in \{0,1\}^n \end{aligned} \quad (54)
\end{aligned}$$

O problema, para cada uma das 9 rodadas estudadas, possuiu 10224 variáveis, em que 1532 variáveis são binárias, muito embora 105 possuam valor fixo (e para fins de performance, convertidas em contínuas) por serem reações artificiais e/ou letais. Existem ainda 11863 restrições (ao todo). Note-se que existem menos variáveis e restrições em comparação ao ReacKnock, muito embora o problema representado ainda seja o mesmo.

Observa-se que as variáveis com informações de cunho biológico correspondem às 1532 (das 10224 estimadas) que representam os fluxos metabólicos do microrganismo estudado. Exceto pelas variáveis binárias, que representam a existência ou não de deleções, as variáveis duais, nesse caso, não são importantes para a etapa de processamento.

A Tabela 5 é um excerto da Tabela resumo (descrita na seção 4.1.6.2.1.) e apresenta os resultados do ARK, comparando com os resultados do ReacKnock. Informações adicionais (e.g., parâmetros de otimização e soluções adicionais) podem ser encontradas no arquivo suplementar “SF_Table_5.xlsx” (Tabela resumo completa).

Tabela 5 – Resultados: ARK

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
Succinato	ARK	9,96	0,1173	66,8%	ACt2rpp; ATPS4rpp; CO2tpp; GND; THD2pp.	Sim
Succinato	ReacKnock	9,96	0,1173	66,8%	ACtex; ATPS4rpp; CO2tpp; PGL; THD2pp.	Sim

Alvo	Versão	Fluxoⁱ	Bioⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
Etanol	ARK	18,5	0,104	99,5%	ATPS4rpp; FORtex; GLUDy; O2tex; THD2pp.	Sim
Etanol	ReacKnock	18,5	0,104	99,5%	ATPS4rpp; FORtppi; GLUDy; O2tex; THD2pp.	Sim
Acetato	ARK	23,53	0,106	91,6%	ATPS4rpp; EDA; GLUDy; PGCD; TPI.	Sim
Acetato	ReacKnock	23,53	0,106	91,6%	ATPS4rpp; EDD; GLUDy; PSERT; TPI.	Sim
Hidrogênio	ARK	66,65	0,119	87,0%	ETOHtex; G6PDH2r; H2Otp; PGM; TKT2.	Sim
Hidrogênio	ReacKnock	66,65	0,119	87,0%	ETOHtex; H2Otp; PGL; PGM; TKT2.	Sim
Formiato	ARK	32,08	0,127	73,4%	ACALD; ENO; G6PDH2r; H2Otex; PPS.	Sim
Formiato	ReacKnock	32,08	0,127	73,4%	ACALD; G6PDH2r; H2Otex; PGM; PPS.	Sim
Glicolato	ARK	18,37	0,108	71,5%	ETOHtex; FADRx; G6PDH2r; H2Otex; PGM.	Sim
Glicolato	ReacKnock	22,72	0,146	88,4%	CO2tex; F6PA; G6PDH2r; GLCDpp; PFK.	Sim
D-Lactato	ARK	18,52	0,10	100%	ATPS4rpp; CBMkr; ETOHt2rpp; NDPK3; O2tpp.	Sim

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
D-Lactato	ReacKnock	18,52	0,10	100%	ATPS4rpp; CBMKr; ETOHtex; NDPK3; O2tpp.	Sim
Fumarato	ARK	13,45	0,152	83,6%	CO2tex; CYTBO3_4pp; FORtppi; PDH; PYRtex.	Sim
Fumarato	ReacKnock	13,45	0,152	83,6%	CO2tpp; CYTBO3_4pp; FORtppi; PDH; PYRtex.	Sim
Treonina	ARK	0	0,885	0%	2AGPE160tipp; ECOAH8; FORTppi; PLIPA1E160pp; PSD140.	Não
Treonina	ReacKnock	0	0,885	0%	2AGPE160tipp; LPLIPAL2G161; MLDCP2Bpp; PLIPA1E160pp; PLIPA1E161pp.	Não

i – Unidades em $mmol/(gWD \cdot h)$. *ii* – Unidades em h^{-1}

Seguindo o mesmo molde que a Tabela 4, a Tabela 5 apresenta os resultados de ARK e ReacKnock (versão Trabalho atual) para comparação. Em termos de resultados numéricos das funções objetivo industrial e biológica, todos os resultados são iguais entre os algoritmos (exceto pelo glicolato, discutido a seguir). As deleções possuem alvos similares (exceto para o glicolato e treonina), em que esses variam entre reações em série sem ramificações (e.g., “CO2tex” e “CO2tpp” para fumarato). Em outras palavras, apesar de alguns nomes de reações serem diferentes, o resultado é o mesmo. Diferentes reações podem impedir que a mesma região do metabolismo seja alimentada com carbono. Sendo assim, é razoável assumir que a mudança do ReacKnock para o ARK não afeta o aspecto funcional do algoritmo original (resultado desejado esperado e desejado).

Existem duas exceções para a afirmação acima, o glicolato e a treonina. O primeiro é diferente pois o conjunto de deleções produz um mutante essencialmente diferente, atingindo maiores valores de ambas as funções objetivo. O segundo é diferente pois, não importa qual fluxo seja escolhido para deleção, isoladamente, ou em conjunto, não é possível aumentar a

produção de treonina. Sendo assim, simular o caso supracitado, em que um mesmo ramo do metabolismo pode ser interrompido com diversas reações, nesse caso, esse ramo se estende a todo o metabolismo.

Note-se que o *preset* usado em ambos os casos é o mesmo. As mudanças sugeridas em ARK deveriam tornar o problema menos propenso a perdas de performance. Logo, era esperado que o resultado fosse melhor ou igual aos obtidos pelo ReacKnock (inclusive a versão Trabalho atual). No entanto, para o glicolato, o resultado foi pior. Isso se deve, provavelmente, ao algoritmo da BST, que é realizada por um algoritmo heurístico, esse não possui compromisso nenhum em obter o mesmo resultado, mesmo em condições similares (como é o caso).

Como mencionado no algoritmo anterior, esse resultado endossa a importância de garantir um resultado ótimo global para a BST. Uma vez que o resultado obtido é melhor em ambos os pontos de interesse: a função objetivo biológica e industrial.

Ademais, os resultados da Tabela 5 são suficientes para afirmar que ambos os algoritmos são “iguais” em termos de funcionalidade, em que, o atual (ARK) deve ser mais rápido e menos propenso a erros numéricos.

5.1.2.2.2 Pós-Processamento: ARK

Da mesma forma que no algoritmo anterior, a treonina não passou pelos filtros de verificação iniciais, a mesma é discutida separadamente.

O PPA.1 e 2, tal como no caso anterior, foram encontradas duas ocorrências para hidrogênio e etanol (quatro ao todo). Ambas com ordem de 10^{-9} , ou seja, substancialmente pequenas.

Considerando o filtro referente à variação das variáveis primais quando a variável dual é não nula, o PPA.3 registrou diversas ocorrências: 1 para succinato, 8 para hidrogênio, 4 para o formiato e 4 para o glicolato.

Para o succinato, a reação "ASPO6", consta no caso sequencial, com lacuna da ordem de 10^{-13} (diferença entre LB_i e UB_i). Muito embora, no caso simultâneo, com lacuna da ordem de 10^{-4} , possuindo um valor substancialmente maior. Os dados da otimização apresentam resultado ótimo com violação máxima da ordem de 10^{-13} para a maximização dessa reação (valor, teoricamente, errado, quando comparado com o caso sequencial). Sendo assim, da óptica

de otimização, o resultado do limite superior (que origina a lacuna), não está errado. Adicionalmente, a variável dual para o caso sequencial é nula, enquanto para o caso simultâneo é não nula. A Tabela 6 apresenta um resumo desses resultados:

Tabela 6 – ARK: PPA.3 primeiro filtro

Alvo	Caso	Reação	μ_{1_i}	LB_i^{FVA}	UB_i^{FVA}	μ_{2_i}
Succinato	Seq.	ASPO6	0	0	$-6,38 \cdot 10^{-13}$	0
Succinato	Sim.	ASPO6	0,0101	0	$2 \cdot 10^{-4}$	0

Todas as unidades numéricas primais se encontram em $mmol/(gWD \cdot h)$.

Existem duas possíveis interpretações: (Erro I – AS_{Primal} vs. AS_{Dual}) o conjunto alternativo primal (AS_{Primal}) pode ser alterado pela não unicidade do conjunto alternativo dual (AS_{Dual}). Nesse caso, o valor nulo de ambas as variáveis duais ($\mu_{1_{ASPO6}}$ e $\mu_{2_{ASPO6}}$), do caso sequencial (considerado como “o valor correto”), permitem a variação da reação "ASPO6". Desse modo, o resultado UB_{ASPO6} estaria dentro do esperado. (Erro II – Erro numérico) A hipótese de erro numérico não foi prontamente aceita devido a ordem da lacuna entre os limites reacionais ser consideravelmente maior que a tolerância (10^{-9}).

Para todas as demais funções objetivo, todas as ocorrências foram da ordem de, no máximo, 10^{-9} . Dessa forma, é razoável assumir que essas são um zero numérico.

Considerando o segundo filtro do PPA.3, comparação dos limites reacionais a fim de verificar se ambos AS_{Primal} (do caso sequencial e do simultâneo) são iguais, obteve-se: 2 casos para o succinato, 39 casos para hidrogênio, 51 casos para formiato e 19 casos para glicolato.

Similar ao que ocorreu para o primeiro filtro, foi possível encontrar 2 casos para o succinato (incluindo a própria "ASPO6") e 1 para o hidrogênio. Todos os demais entram na situação em que a violação é pequena o suficiente para ser ignorada. A Tabela 7 apresenta os resultados supracitados:

Tabela 7 - ARK: PPA.3 segundo filtro

Alvo	Caso	Reação	μ_{1_i}	LB_i^{FVA}	UB_i^{FVA}	μ_{2_i}
Succinato	Seq.	ASPO6	0	0	$-6,38 \cdot 10^{-13}$	0
Succinato	Sim.	ASPO6	0,0101	0	$2 \cdot 10^{-4}$	0
Succinato	Seq.	GLYCL	0	0,0065	0,0065	0
Succinato	Sim.	GLYCL	0,0274	0	$1,24 \cdot 10^{-13}$	0
Hidrogênio	Seq.	EAR160x	0	0,0152	0,0152	0
Hidrogênio	Sim.	EAR160x	0	0	0,0152	0

Todas as unidades numéricas primais se encontram em $mmol/(gWD \cdot h)$.

Apesar do segundo filtro ser diferente do primeiro, o aspecto investigado é o mesmo: o porquê de os limites reacionais não estarem fixos.

A discussão da reação “ASPO6” permanece a mesma para as demais. Note-se que pelas demais reações, “GLYCL” e “EAR160x”, que o argumento de “erro numérico” (Erro II) se torna cada vez mais frágil. As simulações (estimação dos limites reacionais), assim como para “ASPO6”, constam como resultado “ótimo” e violação máxima das restrições da ordem de 10^{-7} para ambas as reações. A violação máxima do segundo filtro é da ordem de 10^{-1} .

Dessa forma, é razoável assumir que o Erro I é o mais provável, ou seja, a não unicidade de AS_{Dual} pode afetar o AS_{Primal} . A motivação para tal procede de forma análoga para “GLYCL” e “EAR160x”, tal como ocorreu para “ASPO6”. A variável dual associada ao limite inferior (μ_{1_i}) é nula, bem como a associada ao superior (μ_{2_i}) (para o caso sequencial), permitindo que os limites variem. Isso ocorre para o caso simultâneo, no entanto, considerando que o caso sequencial é o “correto”, existe uma deturpação no AS_{Primal} (a diferença entre os limites reacionais do caso sequencial e o simultâneo).

Observa-se que o “ponto fraco” do MPCC linearizado é justamente a CS (como mencionado no Anexo C). Por mais que, elemento a elemento, ela seja verificada e, aparentemente o problema respeite CS (pelos PPA.1 e 2 é possível verificar isso), ainda existe a possibilidade de resultados diferentes de alguma variável dual satisfazer em todas as Condições KKT (i.e., a preservação do significado matemático não impede a perda de significado geométrico).

Tomando a reação “GLYCL” como exemplo: pela CS as equações $\mu_{1_{GLYCL}}(v_{GLYCL} - LB_{GLYCL}) = 0$ e $\mu_{2_{GLYCL}}(UB_{GLYCL} - v_{GLYCL}) = 0$ devem ser respeitadas. No caso sequencial, tem-se que $0(v_{GLYCL} - 0,0065) = 0$ e $0(0,0065 - v_{GLYCL}) = 0$. Enquanto, no caso simultâneo tem-se que $0,0274(v_{GLYCL} - 0) = 0$ e $0(1,24 \cdot 10^{-13} - v_{GLYCL}) = 0$.

Observa-se que, em ambos os casos a CS é respeitada, porém os limites reacionais são diferentes. Ou seja, a interpretação geométrica (a mesma apresentada na seção 5.1.1. Caso I) é perdida. Dessa forma, o AS_{Primal} do FBA não é o mesmo AS_{Primal} do problema interno do BLPP quando o mesmo é abordado por um MPCC linearizado. O mesmo raciocínio vale para AS_{Dual} . Esse tipo de violação é chamado, nesse manuscrito, de perda de significado geométrico.

Apesar do ReacKnock não apresentar nenhum resultado (exceto para a treonina) de perda de significado geométrico, isso não torna o mesmo isento de falhas. Essa falha, como argumentado, está na estrutura do MPCC linearizado. Não foram encontrados argumentos para defender que a forma como o ReacKnock foi implementado evita esse tipo de problema.

Um questionamento plausível é: por que as reações da Tabela 7? Uma consequência clara é a perda de significado geométrico. No entanto, se não realizado o FVA de ambos os

casos sequencial e simultâneo, se torna difícil detectar esse tipo de violação. Todas as variáveis primais que violam a Slater CQ, em resultados, estão sujeitas a esse tipo de problema (condição suficiente). Ocorre que, após a perda de significado geométrico, a variável primal pode não violar a Slater CQ (e.g., EAR160x para o hidrogênio).

Dado que não existe penalização (pelo menos no ReacKnock e no ARK), o problema é livre para manipular as variáveis duais de forma a obter o resultado ótimo, que é global. Nesse sentido, pelo exposto até o momento, as Condições KKT são respeitadas (para o problema interno, ou seja, o significado matemático é preservado). No entanto a não unicidade do AS_{Dual} , no MPCC linearizado, pode ser manipulada de forma a alterar a topologia do AS_{Primal} a fim de obter o resultado ótimo. Note-se que isso não ocorre no caso sequencial, haja vista que o problema de otimização não possui acesso às variáveis duais, que são obtidas como consequência do mesmo.

Tomando como exemplo a reação “GLYCL”, para a maximização de exportação do succinato, o caso sequencial fixa o fluxo da mesma em $0,0065 \text{ mmol}/(gWD \cdot h)$, enquanto o simultâneo fixa em zero. Observa-se que, para o segundo caso, o problema pode ter manipulado, ainda dentro das Condições KKT, as variáveis duais de forma que nenhum fluxo de carbono fosse desperdiçado, fixando o mesmo em zero, e redirecionando para a função objetivo. Para tanto, deveria ser possível observar um valor de função objetivo maior para o MPCC linearizado. Nesse caso, dado que o valor “aproveitado” é suficientemente pequeno, da ordem de 10^{-9} (para o succinato), é impossível distinguir-se de um erro numérico. Muito embora seja possível verificar isso para a treonina, tanto no ReacKnock, quando no algoritmo atual (a ser discutido em seção posterior).

Diferente do apresentado para o ReacKnock no PPA.4, o ARK apresentou valores substancialmente diferentes de CPD. Esses se encontram na Tabela 8.

Tabela 8 – ARK: PPA.4 CPD

Alvo	CPD
Succinato	19,07
Etanol	5,36
Acetato	0,98
Hidrogênio	-0,29
Formiato	-0,07
Glicolato	-0,11
Lactato	7,70

Alvo	CPD
Fumarato	0,14
Treonina	3,19

Note-se que nenhum dos fluxos objetivo possui, de fato, as variáveis duais pertencentes ao AS_{Dual} do FBA. Não necessariamente o menor CPD resulta na menor lacuna entre os conjuntos. Adicionalmente, note-se que os valores de CPD estão na mesma ordem de grandeza que a assimilação de substrato, sendo assim escolher cada um deles para refazer o processamento não deve impactar negativamente no condicionamento da matriz de restrições.

Caso isso seja realizado não é esperado que o resultado seja diferente, haja vista que a igualdade é mantida (como deduzido no Anexo B). O mesmo é válido para as variáveis duais, sendo assim, o Pertinência ou não ao AS_{Dual} não significa que a perda de significado geométrico seja solucionada.

O PPA.5, tal como para o ReacKnock, apresentou que todas as rodadas violaram a Slater CQ em soluções, para o presente não foi diferente. As reações são as mesmas com a adição da "GLCptspp", que está presente para o D-Lactato. Note-se que essa é uma reação da cadeia de assimilação de substratos, tal como ocorre com diversas reações de assimilação de oxigênio. Dessa forma, entre ambos os resultados, o PPA.5 foi praticamente igual em ambas os algoritmos.

É válido ressaltar que os fluxos examinados no PPA.5 são somente os do caso simultâneo. Somente são considerados os não nulos, haja vista que os nulos podem ser retirados da matriz estequiométrica sem prejuízo. Sendo assim as reações "ASPO6" e "GLYCL" não são apresentadas como resultado.

Note-se que o elo entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker pode ser considerado como preservado (i.e., não existe perda de significado matemático). Haja vista que os PPA.1 e 2 atestam que a CS foi mantida, e a dualidade forte e DF possuem violação com ordem de grandeza coerente (menor que a tolerância). No entanto, isso não implica que as violações da PPA.3, no caso a perda de significado geométrico, possam ser evitadas.

5.1.2.2.3 Treonina

Tal como no algoritmo anterior, a função objetivo é ordens de grandezas diferente do resultado obtido: $\sim 10^{-6}$ para o caso simultâneo e $\sim 10^{-11}$ para o caso sequencial.

Os PPA.1 e 2, tal como apresentado no algoritmo anterior, apresentam violações somente para o primeiro. Foram verificados 7 casos para o PPA.1, em que a maior ordem de grandeza entre eles foi de 10^{-8} . Sendo razoável admitir que nenhuma dessas violações é suficientemente grande.

Para o PPA.3 foram detectados 5 casos de violações para o primeiro filtro (lacuna dos limites reacionais com variável dual associada não nula), em que todos foram da ordem de 10^{-9} . Para o segundo filtro (comparação entre limites reacionais estimados por FVA entre caso sequencial e simultâneo), foram detectadas 1451 violações. A maior violação foi da ordem de 10^{-6} . Em ambos os casos, as violações possuem valores numéricos coerentes com erro numérico.

O PPA.4 obteve um CPD de ordem similar a assimilação de substrato, sendo assim, as variáveis duais estimadas no MPCC linearizado não pertencem ao conjunto alternativo dual do FBA.

O PPA.5 apresentou 81 reações que estão localizadas em uma das extremidades dos limites reacionais. Dessa forma, 81 casos impediram que a Slater CQ fosse verificada.

Pelos PPAs é possível afirmar que, também nesse caso, o elo entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker foi mantido.

Diferente do argumentado para a treonina no ReacKnock, os resultados de succinato e hidrogênio de ARK, corroboram um novo ponto de vista. O MPCC linearizado conseguiria manipular as variáveis duais, ainda que as mesmas não perdessem significado matemático e representassem os multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Mesmo respeitando as Condições KKT, é possível manipular essas variáveis, perdendo o significado geométrico, a fim de atingir o máximo global do MPCC. Esse último, obviamente, não condiz com o máximo global do BLPP.

O que separa o succinato e hidrogênio do ARK da treonina de ambos ARK e ReacKnock, em termos de perda de significado geométrico, é a magnitude das violações e a quantidade. Enquanto o succinato e hidrogênio possuem violações de grande magnitude (0,0068 e 0,0153, respectivamente e ao todo) em 2 e 1 ocorrência respectivamente, a treonina

possui diversas violações (1451) com menor magnitude ($5,7 \cdot 10^{-4}$, ao todo). Embora exista essa diferença, a treonina possui uma diferença perceptível na função objetivo, algo não detectado para succinato e hidrogênio. Isso se deve pelo resultado esperado da treonina ser próximo a zero. Essas pequenas diferenças geram, justamente, um resultado ótimo para treonina substancialmente maior: $5,7 \cdot 10^{-4}$ das violações contribuem para um fluxo de carbono maior para o produto: $2,47 \cdot 10^{-11}$ do caso sequencial vs. $1,51 \cdot 10^{-6}$ do caso simultâneo.

Sendo assim, tanto os resultados da treonina do ReacKnock, quanto do ARK, corroboram que o MPCC linear consegue manipular as variáveis duais para modificar a topologia do problema primal. Observa-se que, apesar de que o resultado da maximização da treonina deveria ser nulo, o resultado do MPCC foi consideravelmente maior para a treonina. Apesar do problema não modificar o balanço de massas ($Sv = 0$), é notório que o mesmo altera os limites reacionais definidos pelo FVA (como apresentado na Tabela 7), sendo assim, o resultado obtido é irreal.

Note-se que, como mencionado no Teorema 2.1 (DEMPE e DUTTA, 2012), a Slater CQ (em soluções) é condição suficiente para que o máximo global do MPCC seja igual ao do BLPP. Os casos supracitados (i.e., succinato, hidrogênio e treonina) foram muito importantes para se afirmar que a Slater CQ em resultados realmente é determinante, mesmo em problemas lineares. Observa-se, no entanto, que mesmo os fluxos fixos em zero podem representar um problema (e.g., GLYCL da Tabela 7). Nesse caso, é razoável afirmar que a Slater CQ dificilmente é satisfeita em biologia de sistemas. Adicionalmente, detectar casos em que a violação dessa implica na mudança do AS_{primal} é igualmente difícil.

Na argumentação sugerida até agora, a violação da Slater CQ em soluções abre margem para variáveis duais associadas aos limites reacionais assumirem valores não nulos. Nesse caso, o MPCC linearizado pode fixar (ou não) variáveis primais de forma a obter um máximo maior do que o BLPP suporta. Sendo assim, a Slater CQ em soluções é muito importante também em BLPP mesmo que esse seja constituído de LPs em ambos os níveis.

Adicionalmente, existe a possibilidade da Slater CQ em soluções não ser violada por uma dada reação enquanto a mesma é mal descrita quanto aos seus limites reacionais. Um exemplo disso é a reação “EAR160x”, da função objetivo industrial hidrogênio (Tabela 7). Encontra-se que, no caso sequencial, o fluxo é fixo (violando a Slater CQ), enquanto para o caso simultâneo o mesmo não é. Dessa forma, é necessário sempre avaliar o caso sequencial ao invés do simultâneo.

Por fim, sem uma análise cuidadosa do caso sequencial, que é uma análise de pós-processamento, é difícil inferir se um dado fluxo do caso simultâneo viola ou não a Slater CQ.

Adicionalmente, para todos os casos de violação do segundo filtro do PPA.3, também é impossível verificar qual de fato foi um erro numérico e qual o algoritmo manipulou as variáveis duais a fim de obter um ótimo global, possivelmente, irreal.

Uma das ambições do ARK, o melhoramento da performance, foi verificado para a fase de pós-processamento (que fez uso do algoritmo Simplex, alvo dessas mudanças). O tempo real para ARK foi, aproximadamente, 2,5 vezes mais rápido.

5.1.2.3 Resultados: ARK-Q

5.1.2.3.1 Processamento: ARK-Q

Para o ReacKnock, em sua fase de processamento, foi possível verificar que os resultados foram condizentes com a literatura. Já na fase de pós-processamento, foi possível verificar que as variáveis duais de fato se comportam como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Embora, nessa mesma fase, foi possível detectar que uma das funções objetivo industriais, a treonina, obteve um resultado inusitado.

Para o ARK, em sua fase de processamento, foi possível verificar que as mudanças não interferiram no significado biológico. Na fase de pós-processamento, as mudanças melhoraram a convergência do Simplex, realizando o mesmo algoritmo 2,5 vezes mais rápido que o ReacKnock. Da mesma forma que seu antecessor, foi possível detectar que algumas funções objetivo industriais (succinato, hidrogênio e treonina), obtiveram resultados inusitados.

Esses resultados, como discutido, podem estar relacionados com a perda de significado geométrico de forma que o MPCC consegue manipular as variáveis duais de forma a distorcer a região viável primal. Uma forma de evitar esse comportamento é reforçar a *CS* e tornar o resultado da otimização forte para as variáveis duais. Essa é exatamente a proposta do ARK-Q, em que sua formulação é rerepresentada a seguir:

$$\begin{aligned}
& \max_{v, \lambda, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4, y} v_{obj} + \delta(LB^t \mu_1 + UB^t \mu_2) - \delta(x^t Q x) \\
& \text{s. t.} \quad \begin{bmatrix} -I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \text{diag}(LB) & 0 \\ I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -\text{diag}(UB) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & I & 0 & M \cdot I & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & I & M \cdot I & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v \\ \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ y \end{bmatrix} \leq \begin{bmatrix} -LB \\ UB \\ 0 \\ 0 \\ M \\ M \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} (C.I.1) \\ (C.I.2) \\ (C.I.3) \\ (C.I.4) \\ (C.I.5) \\ (C.I.6) \end{array} \\
& \begin{bmatrix} 0 & S^t & -I & I & -I & I & 0 & 0 \\ -c^t & -(Sk)^t & (k-LB)^t & (UB-k)^t & k^t & -k^t & 0 & 0 \\ S & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & NK & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v \\ \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \\ y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c \\ -c^t k \\ 0 \\ n-K \\ 1 \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} (C.E.1) \\ (C.E.2) \\ (C.E.3) \\ (C.E.4) \\ (C.E.5) \end{array} \\
& \begin{array}{l} -M \leq \lambda \leq M \\ 0 \leq \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \leq M \\ v, \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n \\ \lambda \in \mathbb{R}^m \\ y \in \{0,1\}^n \end{array} \quad (55)
\end{aligned}$$

A matriz Q é tal que:

$$Q = \begin{bmatrix} 0 & 0 & I & I & 0 & 0 & 0 \\ 0 & I & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & I & I & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & I & I & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & I & I & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & I & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & I \end{bmatrix} \quad (56)$$

Note-se que as restrições são precisamente iguais a ARK, variando somente a função objetivo. Existe um termo quadrático, e um linear, que se complementam formando a CS . Dentro do termo quadrático, a matriz é desenhada para manter a degeneração primal, ao passo que torna todas as outras variáveis passíveis de um ótimo forte (portanto, AS_{Dual} do problema externo se torna um *singleton*). Por fim, existem ainda termos acima da diagonal principal que penalizam a função objetivo caso exista violação no PPA.2.

A quantidade de restrições e variáveis (inteiras e contínuas) permanece igual ao ARK (seção 5.1.2.2.1. Processamento: ARK).

A Tabela 9 é um excerto da Tabela resumo (descrita na seção 4.1.6.2.1.) e apresenta os resultados do ARK-Q, comparando com os resultados do ARK. Informações adicionais (e.g., parâmetros de otimização e soluções adicionais) podem ser encontradas no arquivo suplementar “SF_Table_9.xlsx” (Tabela resumo completa).

Tabela 9 – Resultados: ARK-Q

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
Succinato	ARK-Q	9,96	0,1173	66,8%	ACTex; ATPS4rpp;	Sim

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
Succinato	ARK	9,96	0,1173	66,8%	CO2tex; G6PDH2r; THD2pp. ACt2rpp; ATPS4rpp; CO2tpp; GND; THD2pp.	Sim
Etanol	ARK-Q	18,5	0,104	99,5%	ATPS4rpp; FORtex; GLUDy; O2tex; THD2pp.	Sim
Etanol	ARK	18,5	0,104	99,5%	ATPS4rpp; FORtex; GLUDy; O2tex; THD2pp.	Sim
Acetato	ARK-Q	23,53	0,106	91,6%	ATPS4rpp; EDD; GLUDy; PGCD; TPI.	Sim
Acetato	ARK	23,53	0,106	91,6%	ATPS4rpp; EDA; GLUDy; PGCD; TPI.	Sim
Hidrogênio	ARK-Q	66,65	0,119	87,0%	ALCD2x; ENO; G6PDH2r; H2Otp; TKT2.	Sim
Hidrogênio	ARK	66,65	0,119	87,0%	ETOHtex; G6PDH2r; H2Otp; PGM; TKT2.	Sim
Formiato	ARK-Q	32,08	0,127	73,4%	ACALD; ENO; H2Otex; PGL; PPS.	Sim
Formiato	ARK	32,08	0,127	73,4%	ACALD; ENO; G6PDH2r; H2Otex; PPS.	Sim
Glicolato	ARK-Q	18,37	0,108	71,5%	ETOHt2rpp; FADRx; G6PDH2r; H2Otp; PGM.	Sim

Alvo	Versão	Fluxo ⁱ	Bio ⁱⁱ	FVA (% WT)	Deleções	Verificações
Glicolato	ARK	18,37	0,108	71,5%	ETOHtex; FADRx; G6PDH2r; H2Otex; PGM.	Sim
D-Lactato	ARK-Q	18,52	0,10	100%	ALCD2x; ATPS4rpp; CBMkr; NDPK3; O2tpp.	Sim
D-Lactato	ARK	18,52	0,10	100%	ATPS4rpp; CBMkr; ETOHt2rpp; NDPK3; O2tpp.	Sim
Fumarato	ARK-Q	13,45	0,152	83,6%	CO2tpp; CYTBO3_4pp; FORtppi; PDH; PYRtex.	Sim
Fumarato	ARK	13,45	0,152	83,6%	CO2tex; CYTBO3_4pp; FORtppi; PDH; PYRtex.	Sim
Treonina	ARK-Q	0	0,885	0%	AGDC; FE2t3pp; GLCtexi; ORNtex; PGPP160.	Não
Treonina	ARK	0	0,885	0%	2AGPE160tipp; ECOAH8; FORTppi; PLIPA1E160pp; PSD140.	Não

i – Unidades em $mmol/(gWD \cdot h)$. *ii* – Unidades em h^{-1}

É possível verificar na Tabela 9 que todos os resultados numéricos são iguais aos obtidos para ARK. Isso reitera a concepção da estratégia adotada para a função objetivo, em que a perturbação adicionada (precedida pela multiplicação do termo δ), não afetou negativamente os resultados ótimos para a função objetivo industrial (PLOCH *et al.*, 2020).

Adicionalmente, perturbações na função objetivo podem balizar a escolha dos alvos de deleção, nesse caso, com um δ suficientemente grande, seria possível experimentar tais resultados. É perceptível, pela Tabela 9, que os alvos de deleção não foram alterados entre o

ARK e o ARK-Q. As diferenças, em termos de nome, como mencionado, se devem a reações do mesmo “ramo”, em que inibir dois alvos diferentes inibem, necessariamente, o fluxo desejado. Dessa forma, em adição a análise supracitada, é possível afirmar que o δ escolhido é suficientemente pequeno para tornar o ótimo do problema externo forte para as variáveis duais, sem perdas em termos de funcionalidade.

É válido ressaltar que, apesar da dimensão de δ ser considerada suficientemente pequena, o problema é abordado por outro tipo de *solver*. Esse, por sua vez, tende a ser mais exigente, haja vista que um MILP é menos custoso de se solucionar que um MIQP (caso atual). Essa exigência afeta somente a fase de processamento (uma vez que a fase de pós-processamento somente soluciona LP, uma vez que a função objetivo é substituída). Note-se que, apesar do maior esforço computacional necessário, não se identificou diferenças de resultado quando comparado com o ARK.

Para a treonina, os alvos de deleção diferiram completamente entre os três algoritmos. Como mencionado, o fluxo esperado para a maximização da treonina deveria ser nulo, independentemente do número de deleções. Nesse caso, o número de soluções alternativas (para as variáveis binárias), é substancialmente alto. Dessa forma é natural que ocorram divergências entre os resultados.

Mesmo considerando a perda de significado geométrico, em que o MPCC tenta maximizar a função objetivo pela manipulação das variáveis duais, o ganho associado pode não ser grande o suficiente para justificar uma diminuição acentuada das soluções alternativas. Isso é observável em todas as outras funções objetivo industriais, em que as soluções alternativas se resumem a alguma reação da mesma série (sem ramificações), e não na troca da “estratégia de deleções”.

5.1.2.3.2 Pós-Processamento: ARK-Q

A motivação da alteração da função objetivo (única diferença entre o ARK e o ARK-Q) foi o possível benefício na solução do problema externo ser classificada como forte além de penalizar a função objetivo caso não siga a CS. Sendo assim, os principais ganhos seriam detectados pelos PPAs.

Tal como realizado nas seções similares dos algoritmos anteriores, a treonina é discutida separadamente.

Para o PPA.1 e 2 não foi detectada nenhuma ocorrência. Esse resultado mostra que, ao contrário do ARK, em que se detectaram 4 ocorrências, a mudança da função objetivo foi satisfatória.

Para o PPA.3, o primeiro filtro (variação das variáveis primais quando a variável dual associada é não nula) foram detectadas: 9 ocorrências para hidrogênio, 9 ocorrências para formiato e 3 para glicolato. Todas obtiveram violação da ordem de 10^{-9} , não sendo possível diferenciar entre erros numérico (haja vista que a ordem de grandeza é similar a precisão numérica) e a perda de significado geométrico.

Ainda para o PPA.3., o segundo filtro (diferença entre os limites reacionais entre os casos sequencial e simultâneo) foram detectadas: 35 ocorrências para hidrogênio, 40 ocorrências para formiato e 12 para glicolato. Dessas ocorrências, somente 3 obtiveram violação da ordem de 10^{-5} . As demais podem ser desconsideradas pois obtiveram violação da ordem de 10^{-9} .

Tabela 10 – ARK-Q: PPA.3 segundo filtro

Alvo	Caso	Reação	μ_{1_i}	LB_i^{FVA}	UB_i^{FVA}	μ_{2_i}
Hidrogênio	Seq.	"OPHHX"	0	$2,66 \cdot 10^{-5}$	$2,66 \cdot 10^{-5}$	0
Hidrogênio	Sim.	"OPHHX"	0	0	$2,66 \cdot 10^{-5}$	0
Formiato	Seq.	"OPHHX"	0	$2,83 \cdot 10^{-5}$	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0
Formiato	Sim.	"OPHHX"	0	0	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0
Formiato	Seq.	"OPHHX3"	0	0	$1,13 \cdot 10^{-11}$	0
Formiato	Sim.	"OPHHX3"	$9,86 \cdot 10^{-4}$	0	$2,83 \cdot 10^{-5}$	0

Todas as unidades numéricas primais se encontram em $mmol/(gWD \cdot h)$.

A Tabela 10 apresenta os 3 casos com violação da ordem de 10^{-5} . É possível verificar que se trata da mesma reação para ambos os casos, para formiato, a reação "OPHHX3" é uma versão anaeróbia da reação "OPHHX". Ambas catalisam um substrato usado para formação de biomassa (função objetivo do problema interno, FBA), 2-Octaprenil-6-hidroxifenol (2-Octaprenyl-6-hydroxyphenol).

Ambas as reações são irreversíveis, formando o composto usado na biomassa. A alteração feita pelo MPCC linearizado retira fluxo de carbono dessa reação, enquanto, no caso sequencial, esse fluxo existe. O mesmo foi realizado para a reação "GLYCL", na maximização do succinato, fazendo uso de ARK.

Esses casos ilustram a chamada perda de significado geométrico, haja vista que as variáveis duais podem ser tidas como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. No entanto,

o MPCC linearizado foi apto a alterar o conjunto alternativo dual (AS_{Dual}), de forma a alterar a topologia do conjunto alternativo primal (AS_{Primal}). Nesse caso, é razoável sugerir que esse fluxo de carbono pode ter sido redirecionado para a formação de produto (i.e., função objetivo industrial). Note-se que esse tipo de comportamento pode ser considerado como uma falha, uma vez que na realidade esse fluxo pode ser não nulo (como apresenta o caso sequencial). Note-se ainda que, na prática, o algoritmo deletou essas reações sem o uso de variáveis binárias, mas sim com o uso das variáveis duais.

Tal como mencionado na seção 5.1.2.2.2. Pós-Processamento: ARK, esses alvos podem ser escolhidos pois violam a Slater CQ em soluções (por estarem fixos em um dos limites reacionais). No entanto, não é possível dizer o porquê desses alvos terem sido escolhidos (e nenhum outro a ver com a produção de biomassa, por exemplo).

Logo, apesar da troca da função objetivo, a abordagem quadrática também está sujeita a esse problema.

Para o PPA.4, nenhuma das rodadas mostrou um resultado ótimo das variáveis duais de forma que elas pertençam ao conjunto alternativo dual (AS_{Dual}) do caso sequencial. Em comparação ao ARK, obteve-se CPDs da mesma ordem de grandeza, exceto para o glicolato, que foi da ordem de 10^2 . Resultados consideravelmente maiores para o CPD já eram esperados, haja vista que a função objetivo obriga um ótimo forte do lado dual. De forma similar ao ARK, a implementação de um CPD dessa dimensão não deve prejudicar substancialmente o condicionamento da matriz das restrições.

Para o PPA.5 foi possível verificar, tal como para os algoritmos anteriores, que todas as rodadas violaram a Slater CQ para soluções. Similar ao ARK, as reações são sempre as mesmas, sem novas adições. Esse resultado era esperado, haja vista que os termos adicionados a função objetivo não deveriam afetar o lado primal, tampouco os resultados das deleções foram diferentes.

Para o presente algoritmo, assim como nas demais, é razoável afirmar que as variáveis duais se comportam como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker. Dessa forma o significado matemático delas é preservado, muito embora seja possível detectar que o MPCC pode ter manipulado o conjunto alternativo dual de forma a obter ótimos ainda maiores (i.e., perda de significado geométrico). Ambas as coisas podem existir concomitantemente.

5.1.2.3.3 Treonina

Tal como nos itens anteriores, a função objetivo é ordens de grandezas diferente do resultado obtido: $\sim 10^{-7}$ para o caso simultâneo e $\sim 10^{-11}$ para o caso sequencial.

O PPA.1 detectou somente 1 violação da ordem de 10^{-9} , sendo possível considerar a mesma dentro da margem de erro. O PPA.2 não registrou nenhuma violação.

Para o PPA.3 foram encontradas violações apenas para o segundo filtro, no caso, 1551. A maior violação é da ordem de 10^{-6} . Ao todo, a violação foi de $6,08 \cdot 10^{-4}$, similar a violação obtida para ARK.

O PPA.4 foi similar em todos os algoritmos, com um CPD de ordem compatível com a assimilação de glicose.

O PPA.5 detectou 82 reações que violam a Slater CQ em soluções, um número similar ao obtido para o ARK.

É possível afirmar, tal como nos algoritmos anteriores, que as variáveis duais se comportaram como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker (i.e., significado matemático preservado). Logo a nova função objetivo, de forma geral, não apresentou melhora significativa entre o ARK e o ARK-Q, tanto na fase de processamento, como na fase de pós-processamento. Exceto pela diminuição das violações PPA.1 (que é penalizada na função objetivo), não houve ganho real. Em ambos os algoritmos, ARK e ARK-Q, existe perda de significado geométrico.

5.1.2.4 Comparações

5.1.2.4.1 Tempo

A principal motivação de alterar as restrições do ReacKnock, transformando-o no ARK, foi o possível ganho de performance. Os resultados apresentados nas seções anteriores mostram que não houve mudanças funcionais entre os algoritmos, restando avaliar o tempo computacional.

O algoritmo de processamento, como mencionado, foi heurístico com tempo fixo em 90 minutos (unidades de trabalho). O tempo computacional máximo foi delineado a fim de obter resultados iguais ou melhores que o estudo original do ReacKnock (XU *et al.*, 2013). Como a referência para eles foi a implementação, supostamente, mais lenta (implementação do ReacKnock), não se observaram resultados diferentes entre todos os algoritmos (para processamento). Adicionalmente, a mudança foi realizada para melhorar a performance em algoritmos Simplex, e não heurísticos. Sendo assim, para a fase de processamento, não se observaram mudanças para os experimentos realizados. É válido ressaltar que se o algoritmo que soluciona os nós da BST for trocado para um do tipo Simplex, espera-se que o resultado do ReacKnock seja inferior quando comparado ao ARK.

Para a fase de pós-processamento houve limitação de tempo computacional por simulação, no entanto as simulações são solucionadas em tempos muito inferiores a 90 min. A rotina mais exigente é o PPA.3, em que é realizado um FVA para cada reação primal, totalizando $2 \cdot n = 3064$ simulações por função objetivo industrial, logo, 27576 simulações de LP. Esse número representa o mínimo de simulações para se realizar a rotina, isso se deve aos problemas de convergência do Simplex (como mencionado na seção 3.1.3.5.1. Problemas de performance). Se o problema retornar com um resultado não ótimo (geralmente *infeasible*, inviável) erroneamente, o mesmo é recalculado com um parâmetro um pouco menos rígido para as tolerâncias. Dessa forma, além do Simplex demorar mais para ser solucionado no ReacKnock, o mesmo pode ter que ser solucionado mais vezes.

Tabela 11 – Tempo Real necessário para todos os PPAs

Algoritmo	Tempo Real
ReacKnock (Trabalho atual)	24 horas e 28 minutos
ARK	9 horas 49 minutos
ARK-Q	8 horas 43 minutos

É possível verificar que o ReacKnock, como esperado, tomou mais tempo que os demais para executar todos os algoritmos de pós-processamento (PPA). É válido ressaltar que, diferente do tempo computacional, o tempo real não é determinístico. Isso significa que o uso de outros *softwares* durante a execução do algoritmo, bem como a temperatura do processador, podem afetar o tempo final. Essa medida foi usada a fim de captar os possíveis casos inviáveis que podem ter sido encontrados, principalmente no ReacKnock, uma vez que esses são descartados.

Essencialmente, o algoritmo PPA.3 é idêntico para ARK e ARK-Q, haja vista que função objetivo é substituída e as restrições de ambos as implementações são iguais. No entanto é

válido ressaltar que o mutante obtido para o ARK e ARK-Q, por mais que sejam iguais do ponto de vista prático, diferem do ponto de vista matemático. Sendo assim, é notório que existam diferenças, como foi o caso. Note-se, no entanto, que essa diferença é muito menor que a diferença em relação ao ReacKnock.

É razoável afirmar que as restrições representadas em ARK e ARK-Q tornam a formulação final mais rápida, sendo esperados resultados importantes de performance quando comparado com o ReacKnock. Esses podem ser estendidos ainda para qualquer função objetivo industrial.

5.1.2.4.2 Perda de significado matemático

Como mencionado no Anexo C, a abordagem sugerida por AUDET *et al.*, 1997 e por BURGARD *et al.*, 2003, possui uma possível falha intrínseca, que motivou o trabalho inicialmente. Uma das Condições KKT, *CS*, é simplificada em uma relação de somatória ao invés de elemento a elemento:

$$\begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \mathbf{v} - \mathbf{LB} \\ \mathbf{UB} - \mathbf{v} \end{bmatrix} = 0 \neq \begin{matrix} \mu_{1_i}(v_i - LB_i) \\ \mu_{2_i}(UB_i - v_i) \end{matrix} \quad i \in I \quad (57)$$

Em outras palavras, a perpendicularidade é mais branda que a complementaridade, em que essa primeira está contida na segunda. Nesse caso, em especial, ambas as condições são iguais, haja visto que ambos os elementos que são multiplicados são maiores ou iguais a zero. Porém ainda estão sujeitas a problemas numéricos.

Note-se que as outras Condições KKT estão isentas de serem desrespeitadas (salvo para um valor grande de violação de restrições): (*i* – *PF*) a viabilidade primal é explícita nas restrições. (*ii* – *DF*) a viabilidade dual é explícita nas restrições. (*iii* – *CS*) A complementariedade é implícita pela dualidade forte (em conjunto com *DF*), e essa, como mencionado, sua violação pode ser fruto da não otimalidade do problema interno.

Caso fosse detectada a violação da *CS* em algum dos resultados das implementações (ReacKnock, ARK e ARK-Q), então o problema interno teria um resultado não ótimo. Seria esperado visualizar um resultado igual, ou similar, ao de um FVA (como mencionado na seção 4.1.5.2.2.). Em nenhum dos casos isso foi observado, quando houve detecção de violação, a mesma foi dentro da margem de erro do algoritmo, ou seja, da ordem de 10^{-9} .

É notável mencionar que respeitar às Condições KKT do problema interno implica que a restrição do BLPP é respeitada. Isso significa que as variáveis duais no MPCC se comportam também como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, em que ambos possuem o mesmo significado matemático.

Não obstante, é válido ressaltar que, com outros *presets* de parâmetros de otimização (não apresentado), principalmente os mais brandos quanto à tolerância, ou ainda considerando um CPD suficientemente grande (não apresentado), foi possível experimentar a perda de significado matemático. Provavelmente o mal condicionamento da matriz das restrições, aliado às violações em número consideravelmente elevados, podem permitir que o problema convirja para um ótimo global do MPCC que seja muito diferente do BLPP.

Ressalta-se ainda que parâmetros mais brandos quanto à tolerância aumentam a região viável sujeita a incerteza numérica de um LP. Dessa forma problemas de convergência se podem se tornar menos comuns, evitando um resultado inviável falso. Adicionalmente esses problemas tendem a ser mais rápidos, característica substancialmente importante em CSOM. Pelo aparato experimental desenvolvido, recomenda-se fortemente fazer uso de parâmetros mais rigorosos com respeito à precisão e à violação de restrições.

Para todos os algoritmos (ReacKnock, ARK e ARK-Q) e todas as rodadas (funções objetivo industriais) foi possível manter o significado matemático das variáveis duais. Sendo assim, virtualmente, nas condições de CSOM e ferramentas de fluxômica em geral (e.g., FBA), aliado a parâmetros mais rigorosos, é razoável assumir que seja possível de se evitar erros desse tipo.

5.1.2.4.3 Pertinência dual

Como apresentado no PPA.4, verificou-se se a solução ótima (somente variáveis duais) do MPCC linearizado pertencia ao conjunto alternativo dual (AS_{Dual}) do problema interno do BLPP, ou seja, um FBA (com as deleções sugeridas).

Em todos os casos não foi possível verificar o Pertinência dual de nenhum dos algoritmos (e.g., ReacKnock, versão Trabalho atual, ARK e ARK-Q), e, para cada um deles, nenhuma rodada (e.g., as nove funções objetivo industriais).

Como apresentando, também no PPA.4, é possível fixar um parâmetro (constante k da função objetivo dual, como apresentado no Anexo B) e calcular um multiplicador capaz de

obrigar a solução ótima do MPCC linearizado pertencer ao AS_{Dual} do FBA do BLPP. Esse multiplicador foi chamado de CPD.

Note-se que refazer o problema com o mesmo CPD sugerido faz com que a solução ótima do MPCC linearizado não necessariamente se altere. Note-se que a escolha de qualquer CPD real não fere a definição de \mathbf{k} (Anexo B), o que mantém a igualdade de dualidade forte. Sendo assim, alterar o \mathbf{k} não altera as restrições, tampouco o CPD. No entanto o \mathbf{k} pode alterar a convergência do algoritmo Simplex, fazendo com o que o resultado seja diferente. Note-se que, por esse último, o novo resultado ótimo do MPCC linearizado pertence não necessariamente ao AS_{Dual} do FBA do BLPP. Em outras palavras, o CPD garante que somente a solução $(\bar{\lambda}, \bar{\mu}_1, \bar{\mu}_2, \bar{\mu}_3, \bar{\mu}_4)$ (um único ponto), pertença ao AS_{Dual} . Se o MPCC linearizado for solucionado novamente e obtiver um resultado diferente para as variáveis duais (haja vista que o ótimo é fraco), o CPD pode diferir do primeiro caso.

Numericamente, um CPD suficientemente grande, pode agravar o mal condicionamento da matriz das restrições de igualdade. Adicionalmente, se isso ocorrer, a violação quanto a possíveis variações das variáveis de otimização do MPCC linearizado pode ser grande o suficiente para se obter resultados não ótimos para o FBA.

Em resumo, qualquer resultado de $(\bar{\lambda}, \bar{\mu}_1, \bar{\mu}_2, \bar{\mu}_3, \bar{\mu}_4)$ do MPCC linearizado possui um CPD capaz de obrigar essas variáveis a pertencerem ao AS_{Dual} do FBA do BLPP. Note-se que a escolha do CPD, na formulação atual, não possui nenhuma vantagem, porém, pode possuir desvantagens como acima-mencionado.

5.1.2.4.4 Perda de significado geométrico

Ao longo dos resultados notou-se que o MPCC linearizado pode alterar as variáveis duais e primais de forma a incrementar a função objetivo industrial. Esse evento é identificado por discrepâncias entre os limites reacionais do caso sequencial e o simultâneo (MPCC linearizado).

Esse evento recebe esse nome, pois, as variáveis primais do MPCC linearizado não necessariamente possuem a mesma viabilidade do que as variáveis primais do BLPP. Sendo assim, a geometria da região viável pode ser diferente entre ambos.

Como observado ao longo das seções 5.1.2.1. – 5.1.2.4. essas discrepâncias podem ser substancialmente grandes, como visto para o succinato (ARK), da ordem de 10^{-2} , ou da ordem da tolerância numérica (10^{-9}). Nesse último caso é difícil distinguir qual deles corresponde a um erro numérico e qual deles corresponde à perda de significado geométrico.

A função objetivo que mais trouxe isso à tona foi a treonina. Nesse caso, esperava-se um zero numérico da ordem de 10^{-11} . No entanto, todos os algoritmos apresentaram um resultado de, no mínimo, 10^{-7} . Como apresentado nas seções de pós-processamento, também, foi possível afirmar que não houve perda de significado matemático das variáveis duais em todas as implementações. Em outras palavras, nenhuma condição KKT (do FBA) foi violada, dessa forma, o resultado ótimo do problema interno é garantido.

As variáveis duais do BLPP são variáveis de otimização no MPCC linearizado. Isso quer dizer que no caso sequencial o problema de otimização não tem acesso as mesmas (embora existam). Dessa forma, o problema de otimização não pode manipular essas para que modifiquem a função objetivo industrial, a tornando ainda maior. No MPCC linearizado existe horizonte para essa manipulação: pela LICQ e MFCQ é sabido que o AS_{Dual} não é um *singleton*. Isso engloba as restrições (DF e dualidade forte), e a CS também não é violada (resultados do PPA.1 e 2) (i.e., respeita-se as Condições KKT). Sendo assim, o simples ato de transformar o BLPP em um MPCC torna o problema suscetível a esse tipo falha.

O algoritmo ARK-Q mostra que, mesmo com um AS_{Dual} unitário, ainda é possível observar a perda de significado geométrico. Note-se que, dada a alteração na viabilidade primal, não necessariamente o AS_{Dual} de um FS idêntico ao caso sequencial, é igual a um AS_{Dual} do FS do MPCC linearizado.

O conjunto alternativo primal (AS_{Primal}) é o conjunto de todos os fluxos viáveis dada a maximização da biomassa (FBA). A perda de significado geométrico se dá somente para reações que estão na extremidade desse novo conjunto (i.e., Slater CQ em soluções). Sendo assim, pela interpretação da CS , a variável dual associada ao limite reacional correspondente (μ_i) é maior ou igual a zero. Isso abre precedente para algumas opções: (i) o algoritmo pode decidir que $\mu_i > 0$, e, sendo assim, fixa-se v_i nessa extremidade (note-se que $\mu_i = 10^{-9}$ está dentro da tolerância numérica e possui o mesmo efeito). Isso ocorreu com a reação “ASPO6”, na maximização de succinato através do algoritmo ARK (Tabela 7). (ii) O algoritmo pode continuar com $\mu_i = 0$ (podendo não diferir do caso sequencial), no entanto o mesmo pode variar o limite reacional de forma a fixar v_i em um novo limite (não necessariamente uma extremidade

da região viável). Isso ocorreu com a reação “EAR160x”, na maximização de hidrogênio através do algoritmo ARK (Tabela 7).

É válido reiterar que, dessa forma, o Teorema 2.1 do estudo de DEMPE e DUTTA, 2012, versa exatamente sobre isso. A violação da Slater CQ, em soluções, pode resultar em um máximo que não concilia o BLPP e sua representação como MPCC. Apesar da Slater CQ não ser necessária para a dualidade forte ser válida em LPs, a mesma ainda se faz necessária nesse caso.

No contexto de biologia de sistemas verificar a Slater CQ em soluções é algo dificilmente observável para GEMs e para alguns algoritmos. Como mencionado, a matriz estequiométrica é degenerada pelas linhas e pelas colunas (i.e., representação do metabolismo). Logo, pela MFCQ, ambos os problemas primal e dual possuem ótimos fracos e variáveis ilimitadas. Ainda que se aumente os limites reacionais em um δ , a característica de “variáveis ilimitadas”, também, pela violação da MFCQ, garante que essa estratégia falhe. Dessa forma, a solução possui, obrigatoriamente, fluxos que violam a Slater CQ em soluções. Não obstante, existem vias do metabolismo para as quais o algoritmo não destina carbono. Dessa forma, é natural que essas reações, se irreversíveis, estejam fixas em zero.

Adicionalmente, apesar de um ótimo fraco agregar certa complexibilidade na verificação da Slater CQ, em soluções (um resultado ótimo em uma extremidade não necessariamente inviabiliza a CQ), é difícil, se não impossível, avaliar isso somente com um MPCC linearizado. Dado que o algoritmo possui a capacidade de manipular os limites reacionais primais (perda de significado geométrico), é possível que uma dada reação, aparentemente, não desrespeite a Slater CQ, em soluções, porém, na verdade, desrespeite. Isso ocorreu com a reação “ASPO6”, na maximização de succinato através do algoritmo ARK (Tabela 7).

É razoável assumir que esse problema, no contexto de ferramentas de fluxômica, fazendo uso de GEMs, seja difícil (se não impossível) de minimizar. Sendo assim, ao solucionar um modelo de um algoritmo CSOM, é natural que, mesmo sem a perda de significado matemático, ocorra a perda de significado geométrico.

Um aspecto importante é que, por mais que a perda de significado geométrico ocorra, não necessariamente o resultado do MPCC linearizado difere (significativamente) do caso sequencial. Foi possível observar que somente a treonina variou significativamente entre os três algoritmos avaliados. Adicionalmente, algo não avaliado no presente manuscrito, bem como na literatura, é se a mudança provocada pela perda de significado geométrico é patológica o suficiente para que o resultado seja inviável. Não obstante, é digno de nota que em alguns casos,

o algoritmo manipulou a região primal de forma a realizar mais deleções que as permitidas por meio de variáveis binárias. Isso ocorreu, por exemplo, com a reação “GLYCL”, na maximização de succinato através do algoritmo ARK (Tabela 7). Essa deleção, não necessariamente ocorre, e essa reação assumir fluxo pode diminuir substancialmente o valor ótimo obtido no MPCC linearizado.

Finalmente, a perda de significado geométrico pode ser interpretada como a sobrecarga de funcionalidade que as variáveis primais e duais devem possuir no MPCC. Isso é, pela teoria da dualidade (Anexo B), o problema primal não é relacionado com o problema dual (exceto pela dualidade forte e complementariedade). Porém, no presente contexto, ambas as variáveis estão conectadas ao mesmo problema de otimização, sendo assim, a perda de significado geométrico, um tipo de comportamento novo, pode ser apreciada.

De forma menos formal, é possível sintetizar a seguinte analogia: As restrições do LP primal descrevem como as paredes de um labirinto estão configuradas. As restrições do LP dual descrevem como o caminho deve ser tomado para que o labirinto seja resolvido de forma ótima. Permitir um problema manipular as “paredes” do labirinto (restrições do problema primal) e o “segredo” (caminho para o fim, restrições do problema dual), pode formar justamente a perda de significado geométrica. Nesse caso, é razoável propor que o algoritmo feche algumas passagens ou fixe uma largura de modo a diminuir o tempo de solução do mesmo (i.e., melhorar a função objetivo de forma irreal).

Dado que não foi encontrada literatura sobre a perda de significado geométrico, é natural que se ressalte sua importância e consequências. Muito embora no presente manuscrito não se apresentem nem se discutam formas de evitar a mesma.

5.1.2.5 Experimentos não realizados

5.1.2.5.1 FVA do problema dual

O FVA das variáveis primais, em ambos os casos sequencial e simultâneo (restrito ao problema interno), foi realizado para a melhor combinação de deleções de cada função objetivo.

Dessa forma foi possível avaliar se o conjunto alternativo primal (AS_{Primal}) era o mesmo entre as condições (PPA.3).

Naturalmente se esperava o mesmo para as variáveis duais. Foram encontradas duas dificuldades para tal:

(i – Tempo de simulação) Ao todo, para o pós-processamento, foram necessárias, aproximadamente, 43 horas. A maior parte desse tempo foi dedicado ao PPA.3, ou seja, FVA das variáveis primais. Note-se que, existem n variáveis primais, muito embora existem $m + 2n$ variáveis duais (desconsiderando as variáveis duais da abordagem bilinear, Anexo D). No presente caso, isso resulta em um aumento de, aproximadamente, 2,67 vezes mais problemas de otimização. Caso esse aumento fosse proporcional (1:1), seria esperado um tempo total de, aproximadamente, 158 horas (um pouco menos de uma semana).

(ii – Dificuldades técnicas) Um algoritmo para essa análise de pós-processamento foi implementado. Ao se executar o mesmo, notou-se dificuldade em encontrar o mínimo das variáveis duais associadas aos limites inferiores (zero). Somente era possível apreciar a convergência ao se considerar uma perturbação suficientemente grande que permitisse resultados negativos (nesse caso, -10^{-12}). A possibilidade de um multiplicador de Kuhn-Tucker ser negativo vai contra a teoria de programação matemática.

Por ambos os motivos a mesma análise não foi conduzida. Dada a perda de significado geométrico e os resultados do PPA.4, espera-se que o conjunto alternativo dual seja diferente entre os casos sequencial e simultâneo.

5.1.2.5.2 MOMA

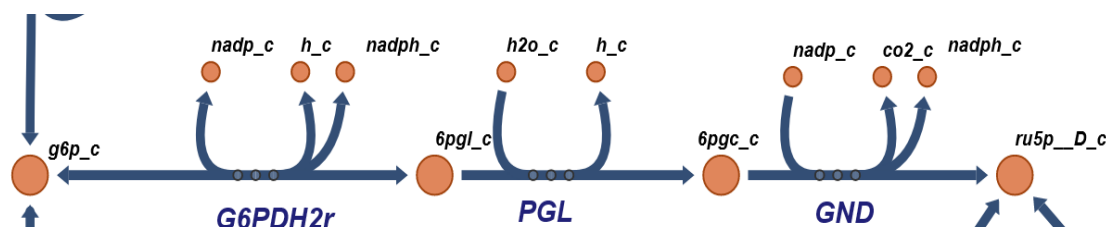
Foram obtidos, ao menos, quatro resultados alternativos (i.e., conjunto das melhores combinações de deleções subótimas). Esses resultados passaram por uma triagem a fim de conterem exatas cinco deleções únicas (i.e., a combinação de deleções não se repete).

Tal como apresentado na seção 3.1.1.3 MOMA, é possível aplicar o algoritmo para verificar qual a combinação de deleções que está menos distante do WT. Espera-se que essa sugestão de mutante seja mais provável de se comportar como o esperado.

A maior parte dos mutantes alternativos obtidos difere do melhor por pequenas mudanças na combinação de deleções. Por exemplo: para a maximização de succinato, no

algoritmo ARK, uma única deleção diferencia os dois melhores mutantes: “GND” e “G6PDH2r”. Ambos estão “no mesmo ramo”, e sintetizam, na prática, a mesma deleção, como apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Solução alternativa para a maximização de succinato



Fonte: autor, produzida pela ferramenta ESCHER (KING *et al.*, 2015)

Sendo assim, o MOMA da maioria dos mutantes seria redundante, haja vista que, do ponto de vista biológico, não existe diferença entre as propostas.

5.1.2.6 Conclusões: Caso II

O principal objetivo do processamento foi o aumento de performance. Obter um conjunto ótimo de deleções para o MILP sugerido (MPCC linearizado) é primordial para etapas subsequentes (i.e., implementação *in vivo*). Os resultados apresentados na seção 5.1.2.4.1., corroboram o fato de que ARK possui performance melhor que o ReacKnock. Adicionalmente, os resultados de processamento mostram que não existe mudança funcional entre ambos os algoritmos. De forma geral, não foi possível identificar custos associados ao ganho de performance.

Para o pós-processamento, o principal objetivo foi verificar como a relação entre o BLPP, problema de interesse, e o MPCC linearizado, representação matemática, era preservada ou prejudicada. Foi possível verificar que existem perdas associadas quando se apresenta o problema da forma sugerida. A principal foi a perda de significado geométrico, como mencionado na seção 5.1.2.4.4., isso pode afetar a viabilidade primal e dual, conduzindo a um resultado ótimo irreal. Muito embora, nos experimentos conduzidos, esse aumento não seja relevante.

A perda de significado matemático (i.e., variáveis duais não se comportarem como multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker) é possível, porém, nos experimentos realizados, a mesma não foi apreciada.

6 CONCLUSÃO

6.1 Conclusões finais

É possível afirmar que todos os objetivos deste trabalho foram alcançados: (I) Foi possível verificar o acoplamento em algoritmos do mesmo tipo que o OptKnock (chamado aqui de significado matemático). (II) As condições de otimalidade do problema interno do BLPP (FBA) foram verificadas em todos os casos estudados. Mesmo existindo a possibilidade da CS ser desrespeitada (numericamente), foi possível verificar a mesma permanece preservada. (III) Foi possível encontrar algumas falhas no algoritmo original, OptKnock, que são discutidas em maiores detalhes na seção 6.2.

Durante a busca da preservação do significado matemático entre as variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, foi possível concluir que pode ocorrer a perda de significado geométrico. Isto é, o MPCC linearizado é capaz de alterar a topologia do problema para obter ótimos irrealis.

O primeiro problema, objeto de estudo do trabalho, é ausente em estudos de CSOM. O segundo foi apontado, pela primeira vez, ao longo do presente manuscrito e, por conseguinte, também ausente na literatura de CSOM. Ambos os problemas são fundamentais para garantir que o resultado de fato preserve o significado biológico, que, por sua vez, permite a implementação *in vivo*.

Pelos experimentos conduzidos é razoável assumir que as Condições KKT do problema interno do BLPP são respeitadas (i.e., significado matemático das variáveis duais é mantido). No entanto não é possível garantir que o significado geométrico seja mantido, embora, sua perda, nos experimentos conduzidos, tenha sido desprezível para a função objetivo industrial.

6.2 As falhas de OptKnock

A abordagem da bilinearidade, formada entre as variáveis duais associadas aos limites reacionais e as variáveis binárias, era insatisfatória na versão original (bem como na

reformulada). Isso se deve tanto pelos motivos apresentados no Anexo D, quanto pelos resultados obtidos no manuscrito. O conjunto alternativo dual é não único, sendo suscetível a permitir que uma variável dual seja nula ou não nula, isso também se aplica não somente para as variáveis sugeridas pelos autores do OptKnock (BURGARD *et al.*, 2003), como para todas as outras. Sendo assim, considerar, a priori, se uma variável dual é nula ou não pode conduzir o algoritmo a um erro. Não é coincidência que no livro-texto de um dos autores (MARANAS e ZOMORRODI, 2016 – pág.161), o mesmo mencione que o resultado do OptKnock possa coincidir com o do rendimento máximo teórico (resultado equivalente a um FVA sem considerar a produção de biomassa). Esse resultado condiz com a interpretação da perda de significado matemático, provavelmente, por não implementar corretamente a dualidade forte e, por conseguinte, a *CS*. Note-se que essa explicação concorda, parcialmente, com o exposto por XU *et al.*, 2013.

O primeiro impulso para tentar “controlar” os valores das variáveis duais é justamente adicionar um δ suficientemente pequeno. Dessa forma, um dado fluxo manipulado não atinge o limite inferior ou superior, ao passo que também não afeta o significado biológico. Ocorre que, como mencionado, a matriz estequiométrica é degenerada pelas linhas e colunas, o que resulta na violação da MFCQ do lado dual. Isso implica em variáveis primais ilimitadas, sendo assim, mesmo com um δ suficientemente pequeno, o problema primal é capaz de atingir o limite inferior ou superior.

Observa-se que mesmo com o conceito generalista da função objetivo dual, em que a mesma depende do parâmetro k (como apresentado no Anexo B), não é possível chegar na mesma apresentada no OptKnock.

Sendo assim, a estratégia de trocar a *CS* por uma igualdade mais branda e substituir a mesma pela dualidade forte, gerando o chamado MPCC linearizado, é uma estratégia que se mostrou válida. Essa foi usada tanto no ReacKnock como no OptKnock e diversos outros algoritmos que se inspiraram em ambos. O problema está em como a bilinearidade (entre variável dual e variável binária) é abordada a fim de preservar, ao menos, o significado matemático.

6.3 Recomendações

(*i – k*) Como mencionado ao longo do manuscrito, o parâmetro k pode ser qualquer número real. Preferencialmente um número pequeno a fim de evitar agravar o mal condicionamento da matriz das restrições.

Apesar do valor numérico de k não afetar a igualdade da dualidade forte, o mesmo afeta o gradiente da matriz das restrições. Sendo assim é possível fazer uso de estratégias que procurem facilitar a convergência do algoritmo usado para solucionar o LP (algo não explorado no manuscrito).

(*ii – Limites reacionais*) A escolha dos valores máximos para reações e variáveis duais deve ser realizada com cuidado. Isso se deve, principalmente, pelo aumento da possibilidade de violações de CS e dualidade forte. Encontrar “o valor perfeito” pode ser tão difícil quanto solucionar o problema em si (KLEINERT *et al.*, 2020), nesse caso, um FVA. Como regra geral, é recomendado manter um valor que seja, no máximo, da mesma ordem de grandeza que a assimilação de um dos substratos.

(*iii – preset*) No processo de definir o melhor *preset* de parâmetros (não apresentado), foi possível observar que um conjunto de parâmetros menos rígidos (i.e., com maior tolerância) podia provocar um efeito similar ao mencionado por MARANAS e ZOMORRODI, 2016. O resultado ótimo do MPCC linearizado não condizia com o resultado ótimo do BLPP (caso sequencial). Não necessariamente esse valor era equivalente a um FVA, mas, ao mesmo tempo, não respeitava as condições de otimalidade do problema interno. Dessa forma, é possível que o presente trabalho não tenha apresentado perda de significado matemático pelo fato de considerar a menor tolerância possível. É recomendável escolher o *preset* de parâmetros mais restrito.

(*iv – Representação das restrições*) Depois da explosão combinatória gerada pela combinação de deleções, o principal inimigo de performance é má convergência do Simplex. Como mencionado, isso ocorre em CSOM devido à natureza do metabolismo, no entanto, a forma como as restrições são propostas, afeta a performance do algoritmo. Nesse sentido, é recomendável evitar qualquer dependência linear nas restrições (como foi realizado no algoritmo ARK, quando comparado com o ReacKnock).

(*v – Exploração da não unicidade para as variáveis binárias*) A explosão combinatória provocada pelas variáveis binárias pode ser representada como o maior custo de performance. Em nível reacional, existem diversos cenários equivalentes de deleção. Um deles é representado

pela Figura 7, em que existe um caminho linear (sem ramificações). Sendo assim, qualquer uma das reações pode ser deletada que o resultado será o mesmo. Identificar esse, e outros padrões, pode ser uma estratégia viável em termos de performance, uma vez que o número de variáveis binárias diminuiria consideravelmente.

Por outro lado, dificilmente o nível reacional é deletado *in vivo*. Experimentalmente é mais acessível deletar o gene que sintetiza uma dada reação. Ocorre que as associações GPR são consideravelmente complexas (como apresentado no Apêndice A). Sendo assim, um gene pode sintetizar uma subunidade de mais de uma enzima, que podem possuir funções distintas. Ou ainda podem possuir diversos genes com a mesma função, e a deleção de somente um não implica que a reação cessaria.

A fim de ilustrar a problemática, as deleções (nível reacional) sugeridas para formiato são essencialmente iguais entre ARK e ReacKnock, diferindo apenas pelas reações ENO e PGM. A primeira está associada, de acordo com o *database* BiGG, depende de apenas um gene, o b2779, enquanto a segunda depende de três, b3612, b4395 e b0755. Sendo assim, impedir que a reação ENO ocorra é mais prático que a reação PGM.

De todas as propostas descritas no Apêndice A, a sugerida por MACHADO *et al.*, 2016 demonstra ser a mais promissora. A mesma consegue considerar as associações GPR ao passo que não aumenta significativamente a complexibilidade do problema. Nesse sentido recomenda-se ou um algoritmo de pré-processamento para diminuir o uso de variáveis binárias, ou considerar as associações GPR.

(vi – Algoritmos sugeridos) Enquanto o problema da perda de significado geométrico não é solucionado, ou formas de mitigar o mesmo não são sugeridas, é recomendável executar os algoritmos PPA. Os PPA.1 e 2, junto com a violação máxima das restrições, verificam o significado matemático. Enquanto os demais verificam o significado geométrico.

Por fim, a perturbação, ocasionada pela perda de significado geométrico, nos experimentos conduzidos, foi desprezível na função objetivo. Dessa forma, é razoável assumir que a mesma não influenciou de forma significativa na escolha da combinação de deleções. Embora os fluxos internos possam possuir topologia desconsoante, sendo possível mimetizar deleções. Para análise desses, é recomendável fazer uso da abordagem do caso sequencial (i.e., não realizar FVA do MPCC linearizado, e sim do caso sequencial).

É recomendável também coletar mais mutantes subótimos (parâmetro *poolsolutions* no *solver* usado) a fim de avaliar os fluxos internos de forma a eliminar possíveis resultados que sejam “falsos ótimos”. Por esse último entende-se por resultados que sejam suficientemente maiores pela perda de significado geométrico.

6.4 Possíveis explorações

(i – CPD) Não foi estudado no presente manuscrito formas de manipular o \mathbf{k} de forma a melhorar a convergência do Simplex. Note-se que, como mencionado, qualquer valor desse parâmetro ainda preserva a igualdade da dualidade forte. Dessa forma é possível alterar o valor de \mathbf{k} ao longo das iterações. Esse tipo de característica pode ser útil ao Simplex e diversos outros algoritmos.

(ii – Slater CQ) É sabido que a condição suficiente para um MPCC linearizado perder o significado geométrico para algumas reações é violar a Slater CQ em resultados. Porém, a condição necessária (ou as condições necessárias) para que uma variável que viole a Slater CQ também perca o significado geométrico não foi identificada.

Naturalmente, dado o contexto de biologia de sistemas, o MPCC linearizado só consegue ser mais restritivo que os limites reacionais definidos a priori (\mathbf{LB} e \mathbf{UB}). Adicionalmente, somente se possui interesse em reações que podem assumir fluxo de carbono. Nesse caso, por mais que as reações deletadas, fixas em zero, violem a Slater CQ em resultados, essas não estão sujeitas à perda de significado geométrico.

(iii – Representação da complementariedade) Dada a descrição matemática proposta no presente manuscrito, a abordagem, inicialmente proposta por BUGARD *et al.*, 2003 e AUDET *et al.*, 1997, abre precedente para linearizar restrições com comportamento complementar. É possível substituir $\mathbf{x}^t \mathbf{y} = 0$, em que $x_i = 0$ ou $y_i = 0$, por um conjunto de equações algébricas, o representam a viabilidade primal, dual e a dualidade forte de um problema linear sugerido.

(iv – Deleções por meio da perda de significado geométrico) Como apresentado na seção 5.1.2.3.2. Pós-processamento: ARK-Q, a perda de significado geométrico pode mimetizar deleções. Investigando as condições necessárias para tal, é possível mimetizar deleções sem o uso de variáveis duais. Se isso for possível, com restrições lineares, seria possível vislumbrar um aumento considerável de performance.

6.5 Próximos passos

6.5.1 CSOM Dinâmico

A maximização de produto foi considerada como função objetivo industrial, muito embora, não necessariamente, a mesma seja a função objetivo que maximize a viabilidade econômica de um processo biotecnológico. É sabido que o “reagente” dos processos biotecnológicos, o substrato, pode ser convertido a biomassa ou a produto. Geralmente essa relação é mutuamente exclusiva. De forma prática, essa competição de objetivos pode ser traduzida em diferentes pilares para fins econômicos: (*i* – Produtividade) maximizar o rendimento de biomassa fornece mais unidades produtivas, e por conseguinte, mais produtividade e taxa de produção de produto, mas mais substrato é destinado para essa primeira. Logo, menos substrato é destinado à formação de produto. (*ii* - Rendimento) Por outro lado, maximizar o rendimento de produto (i.e., destinar mais substrato para o produto) aumenta substancialmente a concentração do mesmo, muito embora diminua produtividade e a taxa de produção, uma vez que existem menos unidades produtivas. (*iii* - Concentração) Uma concentração menor de produto aumenta os custos de separação e purificação. A maximização da mesma, por sua vez, pode exigir condições de cultivo inviáveis, ou ainda longos tempos de fermentação (e.g., produção de etanol em baixas temperaturas diminui a inibição por produto, muito embora demande maiores tempos de cultivo).

Equilibrar estes três pilares: concentração, produtividade e rendimento, é um desafio a ser abordado convertendo cada uma dessas métricas em unidades monetárias, e assim avaliar sua viabilidade econômica. Esse tipo de estratégia pode ser chamada de abordagem TRY.

As considerações em CSOM impedem a avaliação da produtividade e da concentração. Isso se deve, pois, a dinâmica não é considerada. Adicionalmente, como hipótese simplificadora, o volume da célula não é estimado, substituindo entradas e saídas por reações artificiais (como mencionado na seção 3.1.1. Fluxômica). Dessa forma ambas produtividade e concentração não conseguem ser estimadas ao longo do tempo.

Sendo assim, deseja-se sugerir algoritmos similares aos CSOM, porém com o nível interno baseado em DFBA ao invés de FBA. Dessa forma, seria possível estimar todas as métricas TRY e, no segundo nível, maximizar um critério econômico. Adicionalmente, a formulação permite que a combinação de deleções seja escolhida ao longo do cultivo

respeitando a fisiologia do microrganismo. Essa funcionalidade pode ser considerada nova, haja vista que, geralmente, se fixa o mutante e, posteriormente, o sujeita a uma análise de viabilidade econômica (ZHUANG *et al.*, 2013).

6.5.2 Resultados redundantes

Como mencionado, existem padrões de deleção que podem resultar em mutantes redundantes em nível reacional. A ocorrência mais comum é de mutantes cuja deleção ocorre em qualquer reação do mesmo ramo (como apresentado na Figura 7). Uma forma de facilitar a implementação das sugestões de deleções *in vivo* seria fazer uma coletânea dessas reações e relacionar, logicamente, quais genes devem ser deletados.

Alternativamente, dado que o intuito é facilitar o trabalho em laboratório, seria interessante considerar as associações GPR no modelo e sugerir, ao invés de reações, genes para deleção. Evitando etapas de pré e pós-processamento. A sugestão proposta por MACHADO *et al.*, 2016 se mostra interessante por adicionar essa funcionalidade e não aumentar substancialmente o custo computacional.

Deseja-se, além de sugerir algoritmos CSOM dinâmicos, realizar as abordagens supracitadas. Dessa forma será possível, para o caso reacional, melhorar a performance (uma vez que seriam necessárias menos variáveis binárias). Para o caso considerando as associações GPR, direcionar melhor quais genes são alvos interessantes para deleções.

REFERÊNCIAS

- ADE, Peter AR et al. Planck 2015 results-xiii. cosmological parameters. **Astronomy & Astrophysics**, v. 594, p. A13, 2016.
- ALTER, Tobias B.; EBERT, Birgitta E. Determination of growth-coupling strategies and their underlying principles. **BMC bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 1-17, 2019.
- AUDET, Charles et al. Links between linear bilevel and mixed 0–1 programming problems. **Journal of optimization theory and applications**, v. 93, p. 273-300, 1997.
- BAESHEN, Nabih A. et al. Cell factories for insulin production. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2014.
- BALAS, Egon; JEROSLOW, Robert. Canonical cuts on the unit hypercube. **SIAM Journal on Applied Mathematics**, v. 23, n. 1, p. 61-69, 1972.
- BARBULOVIC-NAD, Irena et al. Bio-microarray fabrication techniques—A review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 237-259, 2006.
- BARD, Jonathan F. **Practical bilevel optimization: algorithms and applications**. Springer Science & Business Media, 2013.
- BAZARAA, Mokhtar S.; SHERALI, Hanif D.; SHETTY, Chitharanjan M. **Nonlinear programming: theory and algorithms**. John Wiley & Sons, 2013.
- BIEGLER, Lorenz T. **Nonlinear programming: concepts, algorithms, and applications to chemical processes**. Society for Industrial and Applied Mathematics, 2010.
- BIXBY, Robert E. A brief history of linear and mixed-integer programming computation. **Documenta Mathematica**, v. 2012, p. 107-121, 2012.
- BIXBY, Robert E. Solving real-world linear programs: A decade and more of progress. **Operations research**, v. 50, n. 1, p. 3-15, 2002.
- BOCHNER, Barry R. New technologies to assess genotype–phenotype relationships. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 4, p. 309-314, 2003.
- BOYD, Stephen P.; VANDENBERGHE, Lieven. **Convex optimization**. Cambridge university press, 2004.
- BURGARD, Anthony P.; MARANAS, Costas D. Optimization-based framework for inferring and testing hypothesized metabolic objective functions. *Biotechnology and bioengineering*, v. 82, n. 6, p. 670-677, 2003.
- BURGARD, Anthony P.; PHARKYA, Priti; MARANAS, Costas D. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. **Biotechnology and bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 647-657, 2003.
- BUSSIECK, Michael R.; MEERAUS, Alex. General algebraic modeling system (GAMS). In: **Modeling languages in mathematical optimization**. Springer, Boston, MA, 2004. p. 137-157.
- BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. **Journal of molecular endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

- CHOI, Kyeong Rok et al. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 817-837, 2019.
- CHOWDHURY, Anupam; ZOMORRODI, Ali R.; MARANAS, Costas D. Bilevel optimization techniques in computational strain design. **Computers & Chemical Engineering**, v. 72, p. 363-372, 2015.
- COVERT, Markus W. et al. Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks. **Nature**, v. 429, n. 6987, p. 92-96, 2004.
- COVERT, Markus W.; PALSSON, Bernhard Ø. Transcriptional Regulation in Constraints-based Metabolic Models of Escherichia coli* 210. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 31, p. 28058-28064, 2002.
- COVERT, Markus W.; SCHILLING, Christophe H.; PALSSON, Bernhard. Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism. **Journal of theoretical biology**, v. 213, n. 1, p. 73-88, 2001.
- CRICK, Francis. Central dogma of molecular biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561-563, 1970
- DANTZIG, George B. Origins of the simplex method. In: **A history of scientific computing**. 1990. p. 141-151.
- DARWIN, Charles R., 1859. The origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life. **Londen: Murray**.
- DE OLIVEIRA, Rafael D.; LE ROUX, Galo AC; MAHADEVAN, Radhakrishnan. Nonlinear programming reformulation of dynamic flux balance analysis models. **Computers & Chemical Engineering**, v. 170, p. 108101, 2023.
- DEMPE, Stephan; DUTTA, Joydeep. Is bilevel programming a special case of a mathematical program with complementarity constraints?. **Mathematical programming**, v. 131, p. 37-48, 2012.
- DENEGRE, Scott. Interdiction and discrete bilevel linear programming. Lehigh University, 2011. Tese (Doutorado) – Lehigh University.
- EDWARDS, Jeremy S.; PALSSON, Bernhard O. The Escherichia coli MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5528-5533, 2000.
- EGEN, Dennis; LUN, Desmond S. Truncated branch and bound achieves efficient constraint-based genetic design. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1619-1623, 2012.
- ELANDER, R. P. Industrial production of β -lactam antibiotics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 385-392, 2003.
- ELHALLAOUI, Issmail et al. An improved primal simplex algorithm for degenerate linear programs. **INFORMS Journal on Computing**, v. 23, n. 4, p. 569-577, 2011.
- FEIST, Adam M. et al. A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. **Molecular systems biology**, v. 3, n. 1, p. 121, 2007.

FLOUDAS, Christodoulos A. **Nonlinear and mixed-integer optimization: fundamentals and applications**. Oxford University Press, 1995.

FONG, Stephen S. et al. In silico design and adaptive evolution of Escherichia coli for production of lactic acid. **Biotechnology and bioengineering**, v. 91, n. 5, p. 643-648, 2005.

FONG, Stephen S.; MARCINIAK, Jennifer Y.; PALSSON, Bernhard Ø. Description and interpretation of adaptive evolution of Escherichia coli K-12 MG1655 by using a genome-scale in silico metabolic model. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 21, p. 6400-6408, 2003.

FOURIER, J. B. J. Reported in: Analyse des travaux de l'academie royale des sciences pendant l'annee 1824. **Partie mathematique, Histoire de l'Academie Royale des Sciences de l'Institut de France**, v. 7, p. xlvii-ly, 1827.

GLASNER, Jeremy D. et al. ASAP, a systematic annotation package for community analysis of genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 147-151, 2003.

GOMEZ, Jose A.; HÖFFNER, Kai; BARTON, Paul I. DFBAlab: a fast and reliable MATLAB code for dynamic flux balance analysis. **BMC bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2014.

HÄDICKE, Oliver et al. OptMDFpathway: Identification of metabolic pathways with maximal thermodynamic driving force and its application for analyzing the endogenous CO₂ fixation potential of Escherichia coli. **PLoS computational biology**, v. 14, n. 9, p. e1006492, 2018.

HALL, Julian AJ; MCKINNON, Ken IM. The simplest examples where the simplex method cycles and conditions where EXPAND fails to prevent cycling. **Mathematical Programming**, v. 100, n. 1, p. 133-150, 2004.

HARTMANN, András et al. OptPipe-a pipeline for optimizing metabolic engineering targets. **BMC systems biology**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2017.

HEIRENDT, Laurent et al. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0. **Nature protocols**, v. 14, n. 3, p. 639-702, 2019.

HENRY, Christopher S.; BROADBELT, Linda J.; HATZIMANIKATIS, Vassily. Thermodynamics-based metabolic flux analysis. **Biophysical journal**, v. 92, n. 5, p. 1792-1805, 2007.

HIRAYAMA, S. et al. Ethanol production from carbon dioxide by fermentative microalgae. In: **Studies in Surface Science and Catalysis**. Elsevier, 1998. p. 657-660.

HONG, Kuk-Ki; NIELSEN, Jens. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae: a key cell factory platform for future biorefineries. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 16, p. 2671-2690, 2012.

IBARRA, Rafael U.; EDWARDS, Jeremy S.; PALSSON, Bernhard O. Escherichia coli K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 186-189, 2002.

IGNIZIO, James P.; CAVALIER, Tom M. **Linear programming**. Prentice-Hall, Inc., 1994.

IHMELS, Jan; LEVY, Ronen; BARKAI, Naama. Principles of transcriptional control in the metabolic network of Saccharomyces cerevisiae. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 86-92, 2004.

IM, Haesol; WOLKOWICZ, Henry. Revisiting degeneracy, strict feasibility, stability, in linear programming. **European Journal of Operational Research**, v. 310, n. 2, p. 495-510, 2023.

ISHII, Nobuyoshi et al. Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 593-597, 2007.

JELÉN, Paul; TOSSAVAINEN, Olli. Low lactose and lactose-free milk and dairy products-prospects, technologies and applications. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 2, p. 161, 2003.

JENSEN, Paul A.; LUTZ, Kyla A.; PAPIN, Jason A. TIGER: Toolbox for integrating genome-scale metabolic models, expression data, and transcriptional regulatory networks. **BMC systems biology**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2011.

KELEMEN, Olga et al. Function of alternative splicing. **Gene**, v. 514, n. 1, p. 1-30, 2013.

KLEINERT, Thomas et al. There's no free lunch: on the hardness of choosing a correct big-M in bilevel optimization. **Operations research**, v. 68, n. 6, p. 1716-1721, 2020.

KIM, Joonhoon; REED, Jennifer L.; MARAVELIAS, Christos T. Large-scale bi-level strain design approaches and mixed-integer programming solution techniques. *PloS one*, v. 6, n. 9, p. e24162, 2011.

KING, Zachary A. et al. Escher: a web application for building, sharing, and embedding data-rich visualizations of biological pathways. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 8, p. e1004321, 2015.

KING, Zachary A. et al. BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D515-D522, 2016.

LEE, Sang Yup; KIM, Hyun Uk. Systems strategies for developing industrial microbial strains. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 1061-1072, 2015.

LEWIS, Nathan E. et al. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 1, p. 390, 2010.

MACHADO, Daniel; HERRGÅRD, Markus J.; ROCHA, Isabel. Stoichiometric representation of gene-protein-reaction associations leverages constraint-based analysis from reaction to gene-level phenotype prediction. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 10, p. e1005140, 2016.

MACHADO, Daniel; HERRGÅRD, Markus. Systematic evaluation of methods for integration of transcriptomic data into constraint-based models of metabolism. **PLoS computational biology**, v. 10, n. 4, p. e1003580, 2014.

MAIA, Paulo; ROCHA, Miguel; ROCHA, Isabel. In silico constraint-based strain optimization methods: the quest for optimal cell factories. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 45-67, 2016.

MANGASARIAN, Olvi L.; FROMOVITZ, Stan. The Fritz John necessary optimality conditions in the presence of equality and inequality constraints. **Journal of Mathematical Analysis and applications**, v. 17, n. 1, p. 37-47, 1967.

MARANAS, Costas D.; ZOMORRODI, Ali R. **Optimization methods in metabolic networks**. John Wiley & Sons, 2016.

MCQUISTON, John R. et al. Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host-range plasmids. **Electroporation protocols for microorganisms**, p. 143-148, 1995.

MOLENAAR, Douwe et al. Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. **Molecular systems biology**, v. 5, n. 1, p. 323, 2009.

MORANGE, Michel. The Central Dogma of molecular biology. **Resonance**, v. 14, n. 3, p. 236-247, 2009.

MÜLLER, Jonas EN et al. Engineering Escherichia coli for methanol conversion. **Metabolic engineering**, v. 28, p. 190-201, 2015.

NAKAMA, Caroline Satye Martins. **Desenvolvimentos de ferramentas matemáticas para modelagem de sistemas biológicos baseados em fluxos metabólicos e estimação de parâmetros de problemas mal condicionados**. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, University of São Paulo, São Paulo, 2020. doi:10.11606/T.3.2020.tde-13042021-112113. Acesso em: 2023-02-23.

NEIDHARDT, Frederick C. Escherichia coli and Salmonella typhimurium. **Cellular and molecular biology**, v. 1, p. 1225, 1996.

NOOR, Elad et al. Pathway thermodynamics highlights kinetic obstacles in central metabolism. **PLoS computational biology**, v. 10, n. 2, p. e1003483, 2014.

ORTH, Jeffrey D. et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of Escherichia coli metabolism—2011. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 535, 2011.

PEREZ-SAMPER, Gemma et al. The crabtree effect shapes the Saccharomyces cerevisiae lag phase during the switch between different carbon sources. **MBio**, v. 9, n. 5, p. e01331-18, 2018.

PETROVS, Rudolfs; STALIDZANS, Egils; PENTJUSS, Agris. IMFLer: a web application for interactive metabolic flux analysis and visualization. **Journal of Computational Biology**, v. 28, n. 10, p. 1021-1032, 2021.

PHARKYA, Priti; MARANAS, Costas D. An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems. **Metabolic engineering**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2006.

PLOCH, Tobias et al. Simulation of differential-algebraic equation systems with optimization criteria embedded in Modelica. **Computers & Chemical Engineering**, v. 140, p. 106920, 2020.

POSTMA, Erik et al. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of Saccharomyces cerevisiae. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 2, p. 468-477, 1989.

PRICE, Nathan D.; REED, Jennifer L.; PALSSON, Bernhard Ø. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 886-897, 2004.

REDMAN, Melody et al. What is CRISPR/Cas9?. **Archives of Disease in Childhood-Education and Practice**, v. 101, n. 4, p. 213-215, 2016.

REED, Jennifer L. et al. An expanded genome-scale model of Escherichia coli K-12 (iJR904 GSM/GPR). **Genome biology**, v. 4, n. 9, p. 1-12, 2003.

RIZZI, Manfred et al. In vivo analysis of metabolic dynamics in Saccharomyces cerevisiae: II. Mathematical model. **Biotechnology and bioengineering**, v. 55, n. 4, p. 592-608, 1997.

- RODIONOVA, Margarita V. et al. Biofuel production: challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8450-8461, 2017.
- ROMAN, Steven; AXLER, S.; GEHRING, F. W. **Advanced linear algebra**. New York: Springer, 2005.
- ROWE, Elliot; PALSSON, Bernhard O.; KING, Zachary A. Escher-FBA: a web application for interactive flux balance analysis. **BMC systems biology**, v. 12, p. 1-7, 2018.
- SANGER, Frederick; NICKLEN, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SCHELLENBERGER, Jan et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2. 0. **Nature protocols**, v. 6, n. 9, p. 1290-1307, 2011.
- SCHNEIDER, Philipp; KLAMT, Steffen. Characterizing and ranking computed metabolic engineering strategies. **Bioinformatics**, v. 35, n. 17, p. 3063-3072, 2019.
- SCHRIJVER, Alexander. **Theory of linear and integer programming**. John Wiley & Sons, 1998.
- SCHUETZ, Robert; KUEPFER, Lars; SAUER, Uwe. Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in Escherichia coli. **Molecular systems biology**, v. 3, n. 1, p. 119, 2007.
- SCHUSTER, Stefan; PFEIFFER, Thomas; FELL, David A. Is maximization of molar yield in metabolic networks favoured by evolution?. **Journal of theoretical biology**, v. 252, n. 3, p. 497-504, 2008.
- SEGRE, Daniel; VITKUP, Dennis; CHURCH, George M. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 15112-15117, 2002.
- SHEN, Claire R.; LIAO, James C. Metabolic engineering of Escherichia coli for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. **Metabolic engineering**, v. 10, n. 6, p. 312-320, 2008.
- SHIRAI, Tomokazu; KONDO, Akihiko. In Silico Design Strategies for the Production of Target Chemical Compounds Using Iterative Single-Level Linear Programming Problems. **Biomolecules**, v. 12, n. 5, p. 620, 2022.
- SHLOMI, Tomer et al. A genome-scale computational study of the interplay between transcriptional regulation and metabolism. **Molecular systems biology**, v. 3, n. 1, p. 101, 2007.
- SHLOMI, Tomer; BERKMAN, Omer; RUPPIN, Eytan. Regulatory on/off minimization of metabolic flux changes after genetic perturbations. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 102, n. 21, p. 7695-7700, 2005.
- SILVA, L. F. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 245-254, 2004.
- SMALLBONE, Kieran; SIMEONIDIS, Evangelos. Flux balance analysis: a geometric perspective. **Journal of theoretical biology**, v. 258, n. 2, p. 311-315, 2009.

SOH, Keng Cher; HATZIMANIKATIS, Vassily. Network thermodynamics in the post-genomic era. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 3, p. 350-357, 2010.

SUN, Chenhao et al. Dynamic metabolic analysis of *Cupriavidus necator* DSM545 producing poly (3-hydroxybutyric acid) from glycerol. *Processes*, v. 8, n. 6, p. 657, 2020.

TEPPER, Naama; SHLOMI, Tomer. Predicting metabolic engineering knockout strategies for chemical production: accounting for competing pathways. **Bioinformatics**, v. 26, n. 4, p. 536-543, 2010.

TEUSINK, Bas et al. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40041-40048, 2006.

TEUSINK, Bas et al. Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5313-5329, 2000.

THEOBALD, Uwe et al. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 55, n. 2, p. 305-316, 1997.

TOKUYAMA, Kento et al. Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an *Escherichia coli* production strain. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 1542-1551, 2018.

TÜRKAY, Metin; GROSSMANN, Ignacio E. Logic-based MINLP algorithms for the optimal synthesis of process networks. **Computers & Chemical Engineering**, v. 20, n. 8, p. 959-978, 1996.

VANDERBEI, Robert J. et al. **Linear programming**. Springer International Publishing, 2020.

VON KAMP, Axel; KLAMT, Steffen. Growth-coupled overproduction is feasible for almost all metabolites in five major production organisms. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 15956, 2017.

WALTZ, Richard A. et al. An interior algorithm for nonlinear optimization that combines line search and trust region steps. **Mathematical programming**, v. 107, n. 3, p. 391-408, 2006.

WILDE, Oscar. The Picture of Dorian Gray. 1891. **The complete works of Oscar Wilde**, v. 3, p. 184, 2003.

WINSOR, Geoffrey L. et al. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D646-D653, 2016.

XU, Zixiang et al. ReacKnock: identifying reaction deletion strategies for microbial strain optimization based on genome-scale metabolic network. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e72150, 2013.

XU, Zixiang. egKnock: identifying direct gene knockout strategies for microbial strain optimization based on metabolic network with gene-protein-reaction relationships. **bioRxiv**, p. 514653, 2019.

YANG, Laurence; CLUETT, William R.; MAHADEVAN, Radhakrishnan. EMILiO: a fast algorithm for genome-scale strain design. **Metabolic engineering**, v. 13, n. 3, p. 272-281, 2011.

YE, Jane J.; ZHU, D. L. Optimality conditions for bilevel programming problems. **Optimization**, v. 33, n. 1, p. 9-27, 1995.

YIM, Harry et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1, 4-butanediol. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 7, p. 445-452, 2011.

ZHANG, Cheng et al. Logical transformation of genome-scale metabolic models for gene level applications and analysis. **Bioinformatics**, v. 31, n. 14, p. 2324-2331, 2015.

ANEXO A – SLATER CQ EM LP

Considera-se o Problema P :

$$\begin{aligned}
 & \min_{\mathbf{x}} && f(\mathbf{x}) \\
 & \text{s. t.} && \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0} \\
 & && \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0} \\
 & && \mathbf{x} \in \mathbb{R}^l
 \end{aligned} \tag{58}$$

Em que as funções são tais que: $f: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, $g_j: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $J = \{j \in \mathbb{N} | 1 \leq j \leq j_{end}\}$, $h_k: \mathbb{R}^l \rightarrow \mathbb{R}$, tal que $K = \{k \in \mathbb{N} | 1 \leq k \leq k_{end}\}$. Note-se que é possível descrever essa região como $X = \{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^l | \mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{0}, \mathbf{g}(\mathbf{x}) \leq \mathbf{0}\}$. Considera-se ainda que $J_{off} := \{j | g_j < 0\}$ e $J_{on} := \{j | g_j = 0\}$, em que o primeiro está para os índices j que tornam as restrições de desigualdade g_j inativas, e o segundo que tornam g_j ativas (tanto fracamente quanto fortemente).

Em que as Condições KKT são:

$$\begin{aligned}
 \nabla_{\mathbf{x}} L(\bar{\mathbf{x}}, \bar{\boldsymbol{\lambda}}, \bar{\boldsymbol{\mu}}) &= \nabla f(\bar{\mathbf{x}}) + \nabla \mathbf{h}(\bar{\mathbf{x}})^t \bar{\boldsymbol{\lambda}} + \nabla \mathbf{g}(\bar{\mathbf{x}})^t \bar{\boldsymbol{\mu}} = \mathbf{0} \\
 \bar{\mu}_j &\geq 0 \quad j \in J
 \end{aligned} \tag{59}$$

$$g_j(\bar{\mathbf{x}}) \leq 0, h_k(\bar{\mathbf{x}}) = 0 \quad j \in J, k \in K \tag{60}$$

$$g_j(\bar{\mathbf{x}}) \bar{\mu}_j = 0 \quad j \in J \tag{61}$$

Em que $\boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^{k_{end}}$ e $\boldsymbol{\mu} \in \mathbb{R}^{j_{end}}$.

Considera-se ainda que $\mathbf{h}(\mathbf{x})$ e $\mathbf{g}(\mathbf{x})$ são afins, isso é, são lineares. Nesse caso, é possível traduzir ambas para $\mathbf{h}(\mathbf{x}) = \mathbf{A}_h \mathbf{x} + \mathbf{b}_h$ e $\mathbf{g}(\mathbf{x}) = \mathbf{A}_g \mathbf{x} + \mathbf{b}_g$, em que $\mathbf{A}_h \in \mathbb{R}^{j_{end} \times l}$, $\mathbf{A}_g \in \mathbb{R}^{k_{end} \times l}$, $\mathbf{b}_h \in \mathbb{R}^{j_{end}}$ e $\mathbf{b}_g \in \mathbb{R}^{k_{end}}$.

Se deseja avaliar como a Slater CQ se comporta em um LP, uma vez que o mesmo sempre retorna uma solução básica, e isso contraria a definição de Slater CQ em uma solução ótima. Note-se que a mesma pode ser enunciada como: Considera-se que X é um conjunto aberto, em que $\{g_j | j \in J_{off}\}$ sejam pseudoconvexas em $\bar{\mathbf{x}}$ e $\{g_j | j \in J_{on}\}$ sejam contínuas em $\bar{\mathbf{x}}$, e existe um $\mathbf{x} \in X$ que $g_j(\bar{\mathbf{x}}) < 0$ para $j \in J$.

Note-se que, pelas restrições do problema serem lineares, é possível transitar entre restrições de igualdade para de desigualdade livremente:

$$h_k(\mathbf{x}) = \mathbf{A}_h \mathbf{x} + \mathbf{b}_h = \mathbf{0} \leftrightarrow \begin{cases} g_{j_{end}+1}(\mathbf{x}) = \mathbf{A}_h \mathbf{x} + \mathbf{b}_h \leq \mathbf{0} \\ g_{j_{end}+2}(\mathbf{x}) = -\mathbf{A}_h \mathbf{x} - \mathbf{b}_h \leq \mathbf{0} \end{cases} \tag{62}$$

Para o caso contrário, quando se deseja transitar entre restrições de desigualdade para igualdade, somente é possível, sem perda de generalidade, analisando a “força” da solução ótima.

Assume-se que a solução ótima \bar{x} é fraca, se a mesma for forte, então seria possível descartar todos os $g_j(\bar{x}) < 0$ e transformar todos os $g_j(\bar{x}) = 0$ em restrições de igualdade. Avaliando cada restrição, e sua variável dual associada, é possível descrever se é possível transformar uma restrição de desigualdade em um de igualdade sem perda de generalidade.

Se a restrição for fortemente ativa, $\{j | \bar{\mu}_j > 0, g_j(\bar{x}) = 0\}$, então $g_j(\bar{x})$ não é apto a variar de valor, uma vez que isso desrespeitaria CS . Sendo assim, é possível substituir a restrição de desigualdade por uma de igualdade.

Se a restrição for inativa, $\{j | \bar{\mu}_j = 0, g_j(\bar{x}) < 0\}$, é possível remover a mesma do problema, haja vista que é redundante.

Se a restrição for fracamente ativa, $\{j | \bar{\mu}_j = 0, g_j(\bar{x}) = 0\}$, existem duas possibilidades: (i) a solução está fixa em $g_j(\bar{x}) = 0$, nesse caso é possível substituir a mesma por uma restrição de igualdade (pelo mesmo raciocínio de uma restrição fortemente ativa). (ii) a solução não está fixa em $g_j(\bar{x}) = 0$, nesse caso é possível variar \bar{x} de forma que o mesmo ainda pertença a AS_{Primal} .

Sendo assim, para problemas com restrições lineares (incluindo, por conseguinte um LP), é possível assumir que a Slater CQ sempre pode ser satisfeita, e portanto, se o problema for viável, a dualidade forte sempre é verificada. Note-se que, dependendo de como o LP é descrito (restrição fracamente ativa com solução fixa), a Slater CQ em soluções pode não ser satisfeita (muito embora a dualidade forte continue sendo válida).

A.1 Slater CQ em Biologia de sistemas

No contexto de biologia de sistemas, a Slater CQ (em soluções), na maioria das vezes, é desrespeitada em modelos de escala genômica (GEM). Isso se deve, pois, ao fato que a matriz estequiométrica é deficiente pelas linhas e pelas colunas, resultando em um problema dual que não respeita a MFCQ. Por conseguinte, isso faz com que as variáveis primais sejam não únicas e ilimitadas.

Ilustrando: O conjunto FS limita as variáveis primais por cima e por baixo (i.e., $\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$), obrigando que, ao menos um fluxo, seja tal que $v_i = UB_i$ (uma vez que \mathbf{v} é ilimitado). Geralmente esse fluxo é justamente o objetivo, fixando a variável em $v_i = UB_i$. Para casos com um único substrato, é razoável assumir que Slater CQ em soluções é sempre desrespeitada no contexto de biologia de sistemas.

ANEXO B – DUALIDADE EM LP

Considera-se o seguinte problema LP (primal) genérico:

$$\begin{array}{ll}
 \min & -\mathbf{c}^t \mathbf{v} \\
 \mathbf{v} & \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
 & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
 \end{array} \quad (63)$$

Em que $\mathbf{c} \in \mathbb{R}^n$ e é o vetor de otimização. $\mathbf{S} \in \mathbb{R}^{m \times n}$, e pode ser chamado de gradiente das restrições de igualdade (no contexto de biologia de sistemas, chamado de matriz estequiométrica). $\mathbf{LB}, \mathbf{UB} \in \mathbb{R}^n$ são os limites inferiores e superiores definidos previamente. Considerou-se um LP genérico haja vista que é possível considerar um valor arbitrariamente pequeno ou grande caso seja necessário que a variável de otimização (\mathbf{v}) seja livre. $\mathbf{v} \in \mathbb{R}^n$ é a variável de otimização (no contexto de biologia de sistemas, chamado de vetor dos fluxos metabólicos).

É possível decompor \mathbf{v} em componentes positivas, negativas e um dado vetor arbitrário previamente definido, sendo assim: $\mathbf{v} = \mathbf{v}^+ - \mathbf{v}^- + \mathbf{k}$. Dessa forma, o problema primal é tal que:

$$\begin{array}{ll}
 \min & -\mathbf{c}^t \mathbf{v}^+ + \mathbf{c}^t \mathbf{v}^- - \mathbf{c}^t \mathbf{k} \\
 \mathbf{v}^+, \mathbf{v}^- & \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S} \mathbf{v}^+ - \mathbf{S} \mathbf{v}^- + \mathbf{S} \mathbf{k} = \mathbf{0} \quad B.1 \\
 & -\mathbf{v}^+ + \mathbf{v}^- - \mathbf{k} + \mathbf{LB} \leq \mathbf{0} \quad B.2 \\
 & \mathbf{v}^+ - \mathbf{v}^- + \mathbf{k} - \mathbf{UB} \leq \mathbf{0} \quad B.3 \\
 & -\mathbf{v}^+ \leq \mathbf{0} \quad B.4 \\
 & -\mathbf{v}^- \leq \mathbf{0} \quad B.5 \\
 & \mathbf{v}^+, \mathbf{v}^- \in \mathbb{R}^n
 \end{array} \quad (64)$$

Note-se que a Equação 63 e a 64 são equivalentes, com uma descrição matemática pouco diferente.

Considerando a definição de dual lagrangeano, isto é:

$$\begin{array}{ll}
 \max & \theta(\boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}) = \min_{\mathbf{x}} \{f(\mathbf{x}) + \mathbf{h}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\lambda} + \mathbf{g}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\mu} : \mathbf{x} \in X\} \\
 \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu} & \\
 \text{s. t.} & \boldsymbol{\mu} \geq \mathbf{0}
 \end{array} \quad (65)$$

O objetivo, nesta parte, é obter a função objetivo dual, resultado do problema de otimização interno da definição de dual lagrangeano ($\min_{\mathbf{x}} \{f(\mathbf{x}) + \mathbf{h}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\lambda} + \mathbf{g}(\mathbf{x})^t \boldsymbol{\mu} : \mathbf{x} \in X\}$). Note-se que, ao longo da dedução, é possível obter condições para que isso ocorra, que são muito importantes para o problema e interpretação como um todo.

Desse modo, considera-se $\theta(\lambda, \mu)$ como problema interno. Como mencionado na seção 3.1.3.6. Dualidade lagrangeana, é possível escolher qualquer interpretação para X , neste caso: $X = \{\mathbf{v}^+, \mathbf{v}^- \in \mathbb{R}^n | \mathbf{v}^+, \mathbf{v}^- \geq \mathbf{0}\}$. Logo, tem-se que:

$$\begin{aligned} \min_{\mathbf{v}^+, \mathbf{v}^-} \quad & \begin{bmatrix} \mathbf{v}^+ \\ \mathbf{v}^- \\ I \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} (-\mathbf{c} + \mathbf{S}^t \lambda - \mu_1 + \mu_2 - \mu_3) \\ -(-\mathbf{c} + \mathbf{S}^t \lambda - \mu_1 + \mu_2 - \mu_4) \\ -\mathbf{c}^t \mathbf{k} + \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\mathbf{L} \mathbf{B} - \mathbf{k}) + \mu_2^t (\mathbf{U} \mathbf{B} - \mathbf{k}) \end{bmatrix} \\ \text{s. t.} \quad & \mathbf{v}^+, \mathbf{v}^- \geq \mathbf{0} \\ & \mathbf{v}^+, \mathbf{v}^- \in \mathbb{R}^n \end{aligned} \quad (66)$$

Observa-se que $\lambda, \mu_1, \mu_2, \mu_3$ e μ_4 são variáveis duais associadas às restrições $B. 1, B. 2, B. 3, B. 4$ e $B. 5$, respectivamente. Observa-se ainda que a dimensão das mesmas é coerente com o número de equações de cada restrição, portanto $\lambda \in \mathbb{R}^m$ e $\mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n$.

É fácil de visualizar que o problema pode ser ilimitado inferiormente (i.e., o resultado tende a menos infinito) se os coeficientes da função objetivo forem negativos, para tanto, é necessário que:

$$\begin{cases} -\mathbf{c} + \mathbf{S}^t \lambda - \mu_1 + \mu_2 - \mu_3 \geq \mathbf{0} & B.6 \\ -(-\mathbf{c} + \mathbf{S}^t \lambda - \mu_1 + \mu_2 + \mu_4) \geq \mathbf{0} & B.7 \end{cases} \quad (67)$$

Note-se que $B. 6$ e $B. 7$ podem ser somadas, gerando a inequação $-\mu_3 - \mu_4 \geq \mathbf{0}$, o que só é possível se $\mu_3 = \mathbf{0}$ e $\mu_4 = \mathbf{0}$ (haja vista que ambas são maiores ou iguais a zero), por conseguinte, é possível simplificar ambas pela restrição de igualdade $\mathbf{c} - \mathbf{S}^t \lambda + \mu_1 - \mu_2 = \mathbf{0}$.

Assumindo o supracitado, é possível verificar que a função objetivo do problema dual é tal que: $\theta(\lambda, \mu) = -\mathbf{c}^t \mathbf{k} + \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\mathbf{L} \mathbf{B} - \mathbf{k}) + \mu_2^t (\mathbf{U} \mathbf{B} - \mathbf{k})$. Observa-se que $\theta(\lambda, \mu)$ compreende infinitas funções objetivo a partir da definição de um $\mathbf{k} \in \mathbb{R}^n$.

Por fim, o problema dual é tal que:

$$\begin{aligned} \max_{\lambda, \mu_1, \mu_2} \quad & -\mathbf{c}^t \mathbf{k} + \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\mathbf{L} \mathbf{B} - \mathbf{k}) + \mu_2^t (\mathbf{k} - \mathbf{U} \mathbf{B}) \\ \text{s. t.} \quad & \mathbf{c} - \lambda^t \mathbf{S} + \mu_1 - \mu_2 = \mathbf{0} \\ & \mu_1, \mu_2 \geq \mathbf{0} \\ & \lambda \in \mathbb{R}^m \\ & \mu_1, \mu_2 \in \mathbb{R}^n \end{aligned} \quad (68)$$

Em programação linear é sabido que o problema dual (também um LP) é totalmente separado do primal, isto é, não existem variáveis duais no problema primal, tal como não existem variáveis primais no problema dual. Adicionalmente, o dual do dual é o primal. Dado que a função objetivo obtida nesse anexo não é usual em livros da área, bem como em artigos, o dual do dual é deduzido no presente anexo.

Descrevendo a Equação 68 no formato da definição de dual, tem-se que:

$$\begin{aligned}
& \min_{\lambda, \mu_1, \mu_2} \quad \mathbf{c}^t \mathbf{k} - \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\mathbf{k} - \mathbf{L} \mathbf{B}) + \mu_2^t (\mathbf{U} \mathbf{B} - \mathbf{k}) \\
& \text{s. t.} \quad \mathbf{c} - \mathbf{S}^t \lambda + \mu_1 - \mu_2 = \mathbf{0} \quad \text{B. 8} \\
& \quad \quad -\mu_1, -\mu_2 \leq \mathbf{0} \quad \text{B. 9 - B. 10}
\end{aligned} \tag{69}$$

Aplicando, novamente, o problema interno do dual do dual (em que, dessa vez, neste caso: $X = \{\mu_1, \mu_2, \in \mathbb{R}^n | \mu_1, \mu_2, \geq \mathbf{0}\}$) é tal que:

$$\begin{aligned}
& \min_{\lambda, \mu_1, \mu_2} \quad \begin{bmatrix} \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mathbf{I} \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \mathbf{S} \mathbf{t} - \mathbf{S} \mathbf{k} \\ \mathbf{t} + \mathbf{k} - \mathbf{L} \mathbf{B} - \mathbf{u}_1 \\ \mathbf{t} + \mathbf{U} \mathbf{B} - \mathbf{k} - \mathbf{u}_2 \\ \mathbf{c}^t \mathbf{t} + \mathbf{c}^t \mathbf{k} \end{bmatrix} \\
& \text{s. t.} \quad \mu_1, \mu_2 \geq \mathbf{0} \\
& \quad \quad \lambda \in \mathbb{R}^m \\
& \quad \quad \mu_1, \mu_2 \in \mathbb{R}^n
\end{aligned} \tag{70}$$

Para fins de simplificação da nomenclatura, a Equação 68 é classificado como primal, logo \mathbf{t} e \mathbf{u} são suas variáveis duais, que são relacionadas com as restrições de B. 8 a B. 10, respectivamente. Note-se que $\mathbf{t} \in \mathbb{R}^n$ e $\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2 \in \mathbb{R}^n$ e $\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2 \geq \mathbf{0}$.

Diferente do problema anterior, tem-se que λ é livre, muito embora seja possível separá-lo em uma componente positiva e outra negativa. Nesse caso, a condição para que o problema de otimização não seja ilimitado, é que seu coeficiente seja igual a zero. Enquanto, para as demais variáveis, os coeficientes devem ser maiores ou iguais a zero, haja vista que todas as variáveis devem ser positivas. Sendo assim:

$$\begin{cases} \mathbf{S} \mathbf{t} - \mathbf{S} \mathbf{k} = \mathbf{0} & \text{B. 11} \\ \mathbf{t} + \mathbf{k} - \mathbf{L} \mathbf{B} - \mathbf{u}_1 \geq \mathbf{0} & \text{B. 12} \\ \mathbf{t} + \mathbf{U} \mathbf{B} - \mathbf{k} - \mathbf{u}_2 \geq \mathbf{0} & \text{B. 13} \end{cases} \tag{71}$$

Note-se que $\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2 \geq \mathbf{0}$, logo ambos são redundantes nas inequações B. 12 e B. 13, sendo possível remover ambos os termos (i.e., movendo \mathbf{u}_1 para o lado direito da inequação B. 12 tem-se que $\mathbf{t} + \mathbf{k} - \mathbf{L} \mathbf{B} \geq \mathbf{0}$). Assim como realizado no dual da Equação 65, é possível notar que, dadas as condições supracitadas (B. 11 – B. 13), a função objetivo do problema dual é: $\mathbf{c}^t \mathbf{t} + \mathbf{c}^t \mathbf{k}$. Pode-se escrever o dual da Equação 68 como:

$$\begin{aligned}
& \max_{\mathbf{t}} \quad \mathbf{c}^t \mathbf{t} + \mathbf{c}^t \mathbf{k} \\
& \text{s. t.} \quad \mathbf{S} \mathbf{t} - \mathbf{S} \mathbf{k} = \mathbf{0} \\
& \quad \quad \mathbf{t} + \mathbf{k} - \mathbf{L} \mathbf{B} \geq \mathbf{0} \\
& \quad \quad \mathbf{t} + \mathbf{U} \mathbf{B} - \mathbf{k} \geq \mathbf{0} \\
& \quad \quad \mathbf{t} \in \mathbb{R}^n
\end{aligned} \tag{72}$$

Observa-se que fazendo uma troca de variável por $\mathbf{t} = \mathbf{v}^+ - \mathbf{v}^-$ se obtém um problema de otimização idêntico à reformulação da Equação 63. Logo, foi possível verificar que o dual do dual de fato retorna ao primal com a função objetivo dual sugerida. Sendo assim, tem-se que

a função objetivo do problema dual da Equação 63 é de fato $\theta(\lambda, \mu) = -\mathbf{c}^t \mathbf{k} + \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\mathbf{L} \mathbf{B} - \mathbf{k}) + \mu_2^t (\mathbf{k} - \mathbf{U} \mathbf{B})$ para um $\mathbf{k} \in \mathbb{R}^n$.

Adicionalmente, note-se que ambas as considerações para que o problema dual fosse limitado (inequações B. 6 e B. 7 para o dual do primal e equações B. 11, B. 12 e B. 13 para o dual do dual) são o “balanço de forças” das Condições KKT. Nesse manuscrito essas são ditas como *DF* (*Dual Feasibility*, viabilidade dual), uma vez que a não existência dessas implica na inviabilidade do problema dual e, portanto, gerando um problema primal ilimitado.

Por fim, como segunda parte deste anexo, deseja-se provar que a dualidade forte não depende da Slater CQ, somente de *CS* (*Complementarity constraints*, a Condição KKT referente a complementariedade). Sendo assim, assume-se que o problema primal e dual são viáveis e possuem resultado ótimo limitado. Assume-se ainda que a dualidade forte, portanto, é válida:

$$-\mathbf{c}^t \mathbf{v} = -\mathbf{c}^t \mathbf{k} + \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\mathbf{L} \mathbf{B} - \mathbf{k}) + \mu_2^t (\mathbf{k} - \mathbf{U} \mathbf{B}) \quad (73)$$

Considerando *DF* ($\mathbf{c} - \mathbf{S}^t \lambda + \mu_1 - \mu_2 = \mathbf{0}$), é possível substituir uma equação na outra e obter um resultado ligeiramente menos exigente que *CS*:

$$\begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \mathbf{v} - \mathbf{L} \mathbf{B} \\ \mathbf{U} \mathbf{B} - \mathbf{v} \end{bmatrix} = 0 \quad (74)$$

Note-se que *CS* é descrita como o produto de cada μ_{1_i} com relação a cada $v_i - \mathbf{L} \mathbf{B}_i$, em que $I = \{i \in \mathbb{N} | 1 \leq i \leq n\}$, e cada um deles é igual a zero (e não a soma de todos, como apresentado acima). Apesar do caso supracitado ser englobado pela definição de *CS*, o mesmo é mais brando que *CS* (i.e., perpendicularidade é um caso especial de complementariedade, sendo esse primeiro mais brando). Sendo possível satisfazer a perpendicularidade (e portanto a dualidade forte), mas não necessariamente a complementariedade (*CS*). Nesse contexto, se violaria uma das Condições KKT, e, portanto, talvez o resultado encontrado para o FBA da formulação inicial não seja ótimo.

Ainda assim, é possível verificar que a dualidade forte somente depende de *CS* para ser válida. A única condição que é pode de invalidar a dualidade forte é a inviabilidade de um dos problemas (primal ou dual).

Por fim, tem-se que é possível investigar as Condições KKT, analiticamente, até o presente ponto. Se um algoritmo CSOM, que fez uso da estratégia proposta por AUDET *et al.*, 1997 e BURGARD *et al.*, 2003, vai respeitar as condições de otimalidade do problema interno (FBA) do MPCC linearizado ou não, depende de investigação *in silico* (que é a proposta do trabalho).

ANEXO C – MPCC EM CSOM

O objetivo deste anexo é apresentar como um MPCC é concebido através de um BLPP no contexto de biologia de sistemas. Não obstante, se deseja ainda apresentar os principais entraves com maiores detalhes e breve descrição matemática de tal.

Tomando como problema a Equação 25, tem-se o seguinte BLPP:

$$\begin{array}{ll}
 \max_{\mathbf{v}} & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
 \text{s. t.} & \\
 \max_{\mathbf{v}} & \mathbf{c}^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0} \\
 & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
 \end{array} \tag{75}$$

Assim como apresentado na seção 3.1.3.7. MPCC, é possível reforçar as condições de otimalidade do problema interno e obter o seguinte problema (apresentado na Equação 78):

$$\begin{array}{llll}
 \max & & & \\
 \mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{bio} & & \\
 \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 & & & \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0} & \text{C. 1} & \\
 & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} & \text{C. 2} & \\
 & \mathbf{c} - \mathbf{S}^t \boldsymbol{\lambda} + \boldsymbol{\mu}_1 - \boldsymbol{\mu}_2 = \mathbf{0} & \text{C. 3} & \\
 & (v_i - LB_i) \mu_{1_i} = 0 & i \in I & \text{C. 4} \\
 & (UB_i - v_i) \mu_{2_i} = 0 & i \in I & \text{C. 5} \\
 & \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 \geq \mathbf{0} & \text{C. 6 - C. 7} & \\
 & \boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^m & & \\
 & \mathbf{v}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 \in \mathbb{R}^n & &
 \end{array} \tag{76}$$

Pelo exposto no fim do Anexo B, é possível verificar que *DF* e dualidade forte são linearmente dependentes com uma condição mais branda da *CS*:

$$\begin{cases} \mathbf{c}^t \mathbf{v} + \boldsymbol{\lambda}^t \mathbf{S}\mathbf{k} + \boldsymbol{\mu}_1^t (\mathbf{LB} - \mathbf{k}) + \boldsymbol{\mu}_2^t (\mathbf{k} - \mathbf{UB}) = \mathbf{c}^t \mathbf{k} \\ \mathbf{c} - \mathbf{S}^t \boldsymbol{\lambda} + \boldsymbol{\mu}_1 - \boldsymbol{\mu}_2 = \mathbf{0} \end{cases} \Rightarrow \begin{bmatrix} \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \mathbf{v} - \mathbf{LB} \\ \mathbf{UB} - \mathbf{v} \end{bmatrix} = 0 \tag{77}$$

Sendo assim, o problema da Equação 76 pode ser simplificado em:

$$\begin{array}{ll}
\max & \\
\mathbf{v}, \boldsymbol{\lambda}, & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{bio} \\
\boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 & \\
s. t. & \mathbf{Sv} = \mathbf{0} \quad \text{C. 1} \\
& \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \quad \text{C. 2} \\
& \mathbf{c} - \mathbf{S}^t \boldsymbol{\lambda} + \boldsymbol{\mu}_1 - \boldsymbol{\mu}_2 = \mathbf{0} \quad \text{C. 3} \\
& \mathbf{c}^t \mathbf{v} + \boldsymbol{\lambda}^t \mathbf{Sk} + \boldsymbol{\mu}_1^t (\mathbf{LB} - \mathbf{k}) + \boldsymbol{\mu}_2^t (\mathbf{k} - \mathbf{UB}) = \mathbf{c}^t \mathbf{k} \quad \text{C. 4} \\
& \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 \geq \mathbf{0} \quad \text{C. 5 - C. 6} \\
& \boldsymbol{\lambda} \in \mathbb{R}^m \\
& \mathbf{v}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2 \in \mathbb{R}^n
\end{array} \quad (78)$$

É possível verificar que a Equação 78 é um problema do tipo LP. A abordagem foi inicialmente sugerida por AUDET *et al.*, 1997 e, em biologia de sistemas, por BURGARD *et al.*, 2003 (OptKnock). Observa-se que a metodologia trocou um problema interno linear por um aumento substancial de variáveis, em outras palavras, se acrescentou um número de variáveis igual ao número de restrições (tanto de igualdade quanto de desigualdade). As possíveis falhas desse tipo de representação são abordadas a seguir.

Note-se que, a priori, já para Equação 76, existem problemas intrínsecos a correspondência entre o BLPP (Equação 25) e o MPCC. (*i* – MPCC e BLPP em um caso geral convexo) DEMPE e DUTTA, 2012, afirmam que a condição suficiente para que o MPCC possua a mesma solução global que o BLPP é a Slater CQ. Como mencionado no Anexo A, para problemas lineares, essa condição pode ser facilmente verificada a partir da verificação de restrições de desigualdade (transitando-as para de igualdade). Não obstante, no Anexo B, é possível verificar que a condição tampouco é importante para a dualidade forte. Essas deduções sugerem que a Slater CQ é desnecessária para a otimalidade do caso de BLPP LP-LP, muito embora não seja possível afirmar.

Adicionalmente, (*ii* – Simplificação LP-LP) não é possível afirmar que o problema é mitigado, tampouco solucionado, ao se considerar uma condição mais branda que a de otimalidade (Equação 78). Nada impede que o problema perca o significado matemático entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker.

Para fins ilustrativos, no primeiro caso (Equação 75), *i* – um MPCC e BLPP em um caso geral convexo, um ponto ótimo no BLPP, pode possuir um resultado ótimo que é inviável no MPCC, por não respeitar a Slater CQ (Exemplo 2.2, DEMPE e DUTTA, 2012).

O segundo caso (Equação 76), *ii* – Simplificação LP-LP, o de interesse no presente manuscrito, além do possível problema supracitado, o mesmo pode fornecer um resultado ótimo no MPCC, mas a otimalidade não ser verificada no problema interno do BLPP. Esse tipo de problema já foi apresentado na literatura, um dos autores do OptKnock afirmou que é possível

que o problema obtenha o rendimento máximo teórico, para a reação de interesse (MARANAS e ZOMORRODI, 2016, pág. 161). Quando esse tipo de problema ocorre, acontece uma cisão entre as variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, em que as variáveis duais, com esse resultado, se tornam apenas variáveis, perdendo todo o significado matemático.

Dada a extensão da literatura de MPCC, é difícil afirmar que existe, mesmo em programação linear, uma forma de reforçar a *CS* de forma linear. Isto é, o problema supracitado pode não possuir formas de evitar a não linearidade.

ANEXO D – BILINEARIDADES EM CSOM

Neste anexo se deseja dar continuidade ao Anexo C, em que, em biologia de sistemas, não se tem interesse somente em propor um BLPP (i.e., observar o funcionamento de um sistema), mas também em modificar a topologia da região viável para atingir um determinado fim (geralmente maximização da função objetivo industrial). Desse modo são impostas variáveis de escolha, ou seja, variáveis binárias. Essas representam uma não linearidade ao se conduzir a metodologia proposta por BURGARD *et al.*, 2003, diferentes autores propuseram diferentes abordagens, que são descritas neste anexo.

Tomando como problema da Equação 75, tem-se o seguinte BLPP:

$$\begin{array}{ll}
 \max_{\mathbf{y}, \mathbf{v}} & \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
 \text{s. t.} & \begin{array}{ll}
 \max_{\mathbf{v}} & v_{bio} = \mathbf{c}_1^t \mathbf{v} \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S} \mathbf{v} = \mathbf{0} \\
 & y_i LB_i \leq v_i \leq y_i UB_i \quad i \in I \\
 & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \\
 & \mathbf{1}^t \mathbf{y} = n - K \\
 & \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
 \end{array}
 \end{array} \quad (79)$$

Como mencionado inicialmente na seção 3.1.3.7. MPCC, o problema acima se trata do ponto de partida para o algoritmo OptKnock e a maior parte dos algoritmos CSOM. Em outras palavras, esse modelo altera a topologia da região viável a fim de obrigar o sistema a maximizar a função objetivo do problema externo ($\mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj}$).

Essa dinâmica, em biologia de sistemas, funciona redistribuindo recursos do metabolismo, por exemplo o substrato (geralmente limitado pela fonte de carbono), da formação de biomassa para a formação de produto. É esperado que ocorra uma diminuição da função objetivo interna ($\mathbf{c}_1^t \mathbf{v} = v_{bio}$, formação de biomassa), em comparação a um caso sem escolha alguma (Equação 25), e que esse carbono seja usado para incrementar a função objetivo externa ($\mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj}$, formação de produto). O principal instrumento para tornar esses contornos ótimos, são deleções de reações (i.e., a mudança na topologia da região viável), que está presente nos limites máximos e mínimos das reações $y_i LB_i \leq v_i \leq y_i UB_i$.

O principal entrave é que a estratégia explanada no Anexo C (substituir a CS do MPCC pela dualidade forte) produz um outro termo não-linear não-convexo:

$$\begin{array}{ll}
 \mathbf{c}^t \mathbf{v} + \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\mathbf{LB} - \mathbf{k}) + \mu_2^t (\mathbf{k} - \mathbf{UB}) = \mathbf{c}^t \mathbf{k} & s/ \text{binárias} \\
 \mathbf{c}^t \mathbf{v} + \lambda^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \mu_1^t (\text{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{LB} - \mathbf{k}) + \mu_2^t (\mathbf{k} - \text{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{UB}) = \mathbf{c}^t \mathbf{k} & c/ \text{binárias}
 \end{array} \quad (80)$$

As multiplicações $\mu_1^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e $\mu_2^t \text{diag}(\mathbf{y})$ produzem o referido termo, adicionalmente, note-se que não existe escolha, sem perda de generalidade, de \mathbf{k} que garanta a eliminação simultânea de ambos os termos.

Foram encontrados, na literatura, três descrições diferentes para lidar com esse termo: (i – OptKnock) o algoritmo publicado por BURGARD *et al.*, 2003, propõe a definição de restrições em que se consideram, a priori da resolução do problema, se os valores de variáveis duais associadas aos limites inferior e superior (nesse manuscrito representado por μ_1 e μ_2) são maiores ou iguais a zero. (ii – RobustKnock) O algoritmo publicado por TEPPER e SHLOMI, 2010, propõe a inserção de uma nova variável contínua em que os limites da mesma condizem com os produtos problemáticos ($\mu_1^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e $\mu_2^t \text{diag}(\mathbf{y})$), substituindo mesmo na dualidade forte. (iii – ReacKnock) O algoritmo publicado por XU *et al.*, 2013, propõe a inserção de uma restrição redundante ($\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$) no problema interno da Equação 27. Essa restrição faz com que, na estrutura final do problema, seja possível descrever as variáveis duais associadas a $\mathbf{LB} \leq \mathbf{v}$ e $\mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$ (i.e., livres de não-linearidades) como multiplicadores de Kuhn-Tucker. Enquanto as variáveis associadas a $y_i \mathbf{LB}_i \leq v_i \leq y_i \mathbf{UB}_i$ são sempre nulas por dependência linear.

D.1 OptKnock

Essa abordagem foi proposta, inicialmente, no artigo original de BURGARD *et al.*, 2003, que foi alvo de críticas por DENEGRE, 2011 e XU *et al.*, 2013. O primeiro argumentou que a função objetivo estaria errada, enquanto o segundo endossou a argumentação do primeiro ao passo que apresentou um estudo cuja experimentação corroborou com retórica até então. A principal crítica é a ausência dos termos $\mu_1^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e $\mu_2^t \text{diag}(\mathbf{y})$, como se esses simplesmente não existissem, exceto para reações associadas a fisiologia do metabolismo sabidas de sua letalidade (i.e., não se pode deletar essas reações, por conseguinte y_i associada é sabido e fixado para não deletar as mesmas) (e.g., ATP de manutenção, a própria produção de biomassa).

Os autores, por meio de um estudo posterior (que se tratava da comparação de algoritmos CSOM), retificou e acrescentou explicações acerca da abordagem (CHOWDHURY

et al., 2015). Uma explicação mais detalhada somente foi apresentada no livro de um dos autores (MARANAS e ZOMORRODI, 2016, pág.161-163).

A abordagem trata de avaliar se uma dada reação possui sua variável dual associada maior que zero ou igual a zero com base na *CS*. Em outras palavras, procura-se obrigar uma reação a possuir folga nas restrições $LB \leq v \leq UB$, e, portanto, obrigar o multiplicador associado a ser nulo. Dessa forma, manipula-se quais termos devem ou não aparecer na dualidade forte.

Existem diversos problemas a serem pontuados prontamente com relação a essa abordagem:

(i – da manipulação dos limites reacionais) Os limites reacionais (***LB*** e ***UB***) geralmente são delineados por um FVA, isso garante que somente valores fisicamente possíveis sejam considerados, como mencionado, nem todos são viáveis em condições de metabolismo (mesmo *in silico*). Os autores não mencionam, mas para conseguir a interpretação desejada é necessário manipular os limites reacionais de forma que um resultado de FVA seja impossível, nesse caso, basta adicionar um δ (i.e., um número muito pequeno) aos limites reacionais. Do contrário (tema do próximo tópico) não é possível afirmar que de fato o multiplicador será nulo. Note-se que, ainda que se adicione δ aos limites reacionais, certas reações simplesmente podem transgredir o FVA, isso ocorre, principalmente, em reações decompostas em uma reação direta e outra inversa. Como apresentado, esse tipo de abordagem impede que o problema dual respeite a MFCQ e torne as variáveis primais (nesse caso os fluxos reacionais) ilimitados, sendo assim, essas reações sempre atingem o limite superior, não importa o tamanho de δ . O exemplo 4.1 de DEMPE e DUTTA, 2012 apresenta a mesma dinâmica citada.

(ii – da relação entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker). É trivial que se deseje preservar a correspondência entre variáveis duais e multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker, sendo assim, assumindo que a mesma é supostamente atingida, ainda existe um problema com essa abordagem. O problema primal interno (FBA) não respeita à LICQ (matriz estequiométrica possui linhas linearmente dependentes), por conseguinte as variáveis duais são não únicas, o que, por conseguinte, não garante que as mesmas podem assumir um valor igual ou maior que zero na otimalidade. Dessa forma, a única forma de garantir que uma variável dual seja nula, é se a mesma não atingir o seu limite superior (ou inferior), o que foi explanado no tópico anterior. Adicionalmente, os resultados do presente manuscrito apontam que existem diversas reações em que os multiplicadores são capazes de assumir zero ou valor positivo para o mesmo ponto ótimo primal.

Toda a argumentação anterior é puramente teórica, no entanto, XU *et al.*, 2013 realizam experimentos que corroboram o argumento de que o OptKnock possui problemas sobre a forma de lidar com as bilinearidades. Note-se que, após a retificação constada no estudo de CHOWDHURY *et al.*, 2015, esse tópico não foi mais contestado e assume-se que está correto.

Por fim, não é recomendável que se faça uso da mesma abordagem. Muito embora XU *et al.*, 2013 tenham apresentado resultados bastante assertivos acerca das possíveis falhas no OptKnock, isso não impediu que diversos outros algoritmos se baseassem no mesmo e, porventura, cometessem o mesmo erro.

D.2 RobustKnock

A proposta consiste em sugerir uma nova variável para substituir $\mu_1^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e $\mu_2^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e um conjunto de restrições, que obrigue essa nova variável a ter os mesmos limites dos produtos problemáticos. Os resultados dos autores foram condizentes com a literatura e, a princípio, não existem problema teóricos perceptíveis. Os autores citam VANDERBEI, 2020 como referência da estratégia supracitada, no entanto não foi encontrado tal conteúdo no livro-texto. Detalhes acerca da inserção da nova variável, bem como do conjunto de restrições, não são abordados no presente manuscrito.

Apesar da proposta solucionar o problema é necessário inserir ambas variáveis e restrições novas ao problema, obviamente sem significado físico. Ao todo são 3 restrições para cada variável nova, que no presente caso demanda $2n$ variáveis (haja vista que existem n produtos para $\mu_1^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e o mesmo número para $\mu_2^t \text{diag}(\mathbf{y})$). Na prática são $2n$ variáveis novas e $6n$ novas restrições, que é um número expressivo para ser introduzido. No melhor dos casos, é possível fixar $\mathbf{k} = \mathbf{UB}$ ou $\mathbf{k} = \mathbf{LB}$ e eliminar metade desse número.

Algoritmos CSOM, do tipo que são explorados no presente manuscrito, são conhecidos por serem mal escalonáveis e computacionalmente desafiadores, sendo assim, quando possível, é recomendável minimizar fontes que aumentariam o tempo computacional.

D.3 ReackKnock

Diferente das abordagens anteriores, o ReackKnock considera somente a inserção de uma nova restrição: $\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$. A ideia por trás dessa abordagem está em como essa nova restrição opera ao se desenvolver a metodologia proposta por BURGARD *et al.*, 2003. O intuito nessa parte é mostrar que, independentemente do valor que a variável binária assume, sempre é possível eliminar os termos não lineares ($\boldsymbol{\mu}_3^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e $\boldsymbol{\mu}_4^t \text{diag}(\mathbf{y})$) e preservar as Condições KKT do problema interno (algo, supostamente, feito de forma ineficiente no OptKnock). Considera-se o problema com a nova restrição:

$$\begin{aligned}
 & \max_{\mathbf{y}, \mathbf{v}} \quad \mathbf{c}_2^t \mathbf{v} = v_{obj} \\
 & \text{s. t.} \quad \max_{\mathbf{v}} \quad v_{bio} = \mathbf{c}_1^t \mathbf{v} \\
 & \quad \quad \quad \text{s. t.} \quad \mathbf{Sv} = \mathbf{0} \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \quad \quad \quad y_i \mathbf{LB}_i \leq v_i \leq y_i \mathbf{UB}_i \quad i \in I \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{1}^t \mathbf{y} = n - K \\
 & \quad \quad \quad \mathbf{y} \in \{0,1\}^n
 \end{aligned} \tag{81}$$

As Condições KKT do problema interno são levemente diferentes, exceto pela adição de novas variáveis duais. Na prática, são adicionadas $2n$ restrições e $2n$ variáveis, muito embora as restrições sejam, em sua maioria, idênticas a $y_i \mathbf{LB}_i \leq v_i \leq y_i \mathbf{UB}_i$, enquanto as variáveis são, também em sua maioria, linearmente dependentes.

O destaque dessa abordagem está nessa dependência linear e na dualidade forte:

$$\mathbf{c}^t \mathbf{v} + \boldsymbol{\lambda}^t \mathbf{S} \mathbf{k} + \begin{bmatrix} \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \\ \boldsymbol{\mu}_3 \\ \boldsymbol{\mu}_4 \end{bmatrix}^t \begin{bmatrix} \mathbf{LB} - \mathbf{k} \\ \mathbf{k} - \mathbf{UB} \\ \text{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{LB} - \mathbf{k} \\ \mathbf{k} - \text{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{UB} \end{bmatrix} = \mathbf{c}^t \mathbf{k} \tag{82}$$

Em que $\boldsymbol{\mu}_1$ e $\boldsymbol{\mu}_2$ estão associados a $\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$ (limite inferior e superior, respectivamente), enquanto, de forma análoga, $\boldsymbol{\mu}_3$ e $\boldsymbol{\mu}_4$ estão associados a $y_i \mathbf{LB}_i \leq v_i \leq y_i \mathbf{UB}_i$.

Pela definição de conjunto alternativo dual (AS , presente na seção 3.1.3.4. Unicidade), tem-se que:

$$AS_{Dual} = \left\{ \boldsymbol{\lambda}, \boldsymbol{\mu}_1, \boldsymbol{\mu}_2, \boldsymbol{\mu}_3, \boldsymbol{\mu}_4 \in W \left| \begin{bmatrix} \mathbf{S} \mathbf{k} \\ \mathbf{LB} - \mathbf{k} \\ \mathbf{k} - \mathbf{UB} \\ \text{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{LB} - \mathbf{k} \\ \mathbf{k} - \text{diag}(\mathbf{y}) \mathbf{UB} \end{bmatrix}^t \left(\begin{bmatrix} \boldsymbol{\lambda} \\ \boldsymbol{\mu}_1 \\ \boldsymbol{\mu}_2 \\ \boldsymbol{\mu}_3 \\ \boldsymbol{\mu}_4 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \bar{\boldsymbol{\lambda}} \\ \bar{\boldsymbol{\mu}}_1 \\ \bar{\boldsymbol{\mu}}_2 \\ \bar{\boldsymbol{\mu}}_3 \\ \bar{\boldsymbol{\mu}}_4 \end{bmatrix} \right) = 0 \right. \right\} \tag{83}$$

Em que:

$$W = \left\{ \lambda \in \mathbb{R}^m; \mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4 \in \mathbb{R}^n \left| \underbrace{\mathbf{c} + \begin{bmatrix} -\mathbf{S}^t \\ -\mathbf{I} \\ \mathbf{I} \\ -\mathbf{I} \\ \mathbf{I} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \lambda \\ \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \end{bmatrix}}_{DF} = \mathbf{0}; \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \end{bmatrix} \geq \mathbf{0} \right. \right\} \quad (84)$$

É conveniente recordar que $\mathbf{y} \in \{0,1\}^n$ e $\mathbf{1}^t \mathbf{y} = n - K$, em que K é pré-definido e, geralmente, $K \ll n$. Não é difícil concluir que, na maioria dos casos, $y_i = 1$, o que torna $y_i LB_i - k_i = LB_i - k_i$ para maioria dos casos, tal como é para o limite superior. Quando isso acontece, ambos são linearmente dependentes, sendo assim não é difícil verificar que μ_1 e μ_3 são linearmente dependentes (tal como μ_2 e μ_4), note-se ainda que o mesmo ocorre com $LB_i \leq v_i \leq UB_i$ e $y_i LB_i \leq v_i \leq y_i UB_i$ para o AS_{Primal} .

A dependência linear provocada no problema primal em $\nabla \mathbf{g}_j(\mathbf{x})$ desclassifica o problema da LICQ, por conseguinte, os multiplicadores de Lagrange e Kuhn-Tucker são não únicos, algo verificado pela dependência linear entre os coeficientes de μ_1 e μ_3 (tal como μ_2 e μ_4). Desse modo, verificando ambas as possibilidades do domínio de y_i :

Se $y_i = 0$, então $0 \leq v_i \leq 0$, isso faz com que, pela CS, μ_1 e μ_2 sejam nulos. Para a dualidade forte os termos problemáticos são reduzidos a zero ($\mu_3^t \text{diag}(\mathbf{y})$ e $\mu_4^t \text{diag}(\mathbf{y})$). Ambos μ_3 e μ_4 assumem valores não nulos a fim de satisfazer a dualidade forte e DF.

Se $y_i = 1$, então $LB_i \leq v_i \leq UB_i$, isso faz com que exista dependência linear entre μ_1 e μ_3 (tal como μ_2 e μ_4). Dessa forma é possível representar μ_1 e μ_3 somente por um valor numérico sem prejuízo, enquanto uma das duas assume zero (tal como para μ_2 e μ_4). Observa-se que essa dependência linear existe tanto em AS_{Dual} , como em DF. Sendo assim não existe nenhuma perda ao considerar que $\mu_3^t \text{diag}(\mathbf{y}) = \mathbf{0}$ e $\mu_4^t \text{diag}(\mathbf{y}) = \mathbf{0}$. Observa-se que não se fixou $\mu_3, \mu_4 = 0$, mas somente os termos problemáticos, permitindo que a abordagem seja válida para ambos os casos.

Entre todas as abordagens mencionadas acima, a proposta no algoritmo ReacKnock (XU *et al.*, 2013) se mostra a que apresenta melhor custo-benefício. A mesma soluciona o problema e, ao mesmo tempo, faz uso de menos variáveis e restrições, que são, na maioria dos casos, linearmente dependentes com as originais. Por esse motivo a mesma foi escolhida para a implementação dos algoritmos enquanto as demais foram descartadas.

ANEXO E – LISTAS ADICIONAIS

Tabela 12 – Lista de Arquivos Suplementares

Gurobi	
Manual de referência	<i>SF_Gurobi_0.pdf</i>
Documentação sobre paralelismo	<i>SF_Gurobi_1.pdf</i>
Recomendação de <i>hardware</i>	<i>SF_Gurobi_2.pdf</i>
ReacKnock	
Pós-Processamento: Tabela Resumo	<i>SF_Table_4.xlsx</i>
Pós-Processamento: Succinato	<i>EX_succ_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Etanol	<i>EX_etoh_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Acetato	<i>EX_ac_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Hidrogênio	<i>EX_h_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Formiato	<i>EX_for_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Glicolato	<i>EX_glyclt_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: D-Lactato	<i>EX_lac_D_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Fumarato	<i>EX_fum_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Treonina	<i>EX_thr_L_e_Run_1.xlsx</i>
ARK	
Pós-Processamento: Tabela Resumo	<i>SF_Table_5.xlsx</i>
Pós-Processamento: Succinato	<i>EX_succ_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Etanol	<i>EX_etoh_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Acetato	<i>EX_ac_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Hidrogênio	<i>EX_h_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Formiato	<i>EX_for_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Glicolato	<i>EX_glyclt_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: D-Lactato	<i>EX_lac_D_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Fumarato	<i>EX_fum_e_Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Treonina	<i>EX_thr_L_e_Run_1.xlsx</i>
ARK-Q	
Pós-Processamento: Tabela Resumo	<i>SF_Table_9.xlsx</i>
Pós-Processamento: Succinato	<i>EX_succ_e_Run_1.xlsx</i>

Pós-Processamento: Etanol	<i>EX_eto_h_e__Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Acetato	<i>EX_ac_e__Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Hidrogênio	<i>EX_h_e__Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Formiato	<i>EX_for_e__Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Glicolato	<i>EX_glyclt_e__Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: D-Lactato	<i>EX_lac_D_e__Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Fumarato	<i>EX_fum_e__Run_1.xlsx</i>
Pós-Processamento: Treonina	<i>EX_thr_L_e__Run_1.xlsx</i>

Todos as planilhas de pós-processamento apresentam os PPA como “RP”.

Tabela 13 – Nomes especiais das equações

Nome	Número da equação
FS	4
FBA	5, 9, 23, 34, 65
MOMA	7
Problema P	8
Função lagrangeana	10, 58
<i>Dual Feasibility (DF)</i>	12, 59
<i>Primal Feasibility (PF)</i>	13, 60
Complementariedade (CS)	14, 43
AS	19, 41, 44, 83
Primal genérico	21
Dual genérico	22
Dual do FBA	24, 50, 70
BLPP	25
OptKnock (Bilevel)	27, 29, 77, 79
OptKnock (MPCC)	28, 78
ReacKnock (Bilevel)	30, 36, 81
ReacKnock (MPCC linearizado)	37, 53
ARK (MPCC linearizado)	38, 54
ARK-Q (MPCC linearizado)	39, 55
CPD	46
pFBA	59

APÊNDICE A - RESTRIÇÕES A TOPOLOGIA EM CSOM E GPR

Existem dois tipos de modificação no espaço nulo: (TIPO I) modificações na matriz estequiométrica. Essas modificações são de caráter redutivo, ou seja, são removidas um ou mais colunas da matriz estequiométrica. Para cada coluna removida, é subtraído uma linha e uma coluna do espaço nulo (Teorema do Núcleo e da Imagem, ROMAN, 2005). Essa redução impacta também no número de variáveis de otimização, o diminuindo. (TIPO II) Modificações nos limites de reação. Nesse caso a ideia é reduzir os limites que cada variável de otimização pode tomar. Esse tipo de modificação não impacta no número de variáveis do problema.

Adicionalmente, é possível acrescentar informações ao problema em níveis hierárquicos biológicos diferentes, nesse sentido, as associações de gene-proteína-reação (GPR). Diversos artigos propõem formas de alterar o espaço FS . Algumas dessas abordagens envolvem restrições com variáveis binárias, enquanto outras envolvem a expansão da matriz estequiométrica de forma a captar as informações desejadas.

Independentemente do tipo de abordagem para limitar o espaço nulo, todas visam refinar a descrição matemática de uma rede metabólica. Sendo assim, todas as abordagens a serem mencionadas nas seções subsequentes podem ser aplicadas quer ao algoritmo CSOM ou ainda às ferramentas supracitadas (e.g., FBA, FVA). Algumas dessas possuem maior facilidade de implementação, enquanto outras são difíceis ou ainda inviáveis.

A.1 Restrições TIPO I

É comum na literatura de CSOM que, ao escolher um dado modelo (i.e., matriz estequiométrica de um dado microrganismo), se realize uma análise preliminar. Essa análise é realizada apenas uma vez antes de se aplicar um algoritmo proposto.

A.2 FVA – TIPO I

Pode-se aplicar um algoritmo envolvendo FVA em que pode-se propor um mínimo de fluxo objetivo (e.g., produção de produto ou biomassa). Para cada reação da rede metabólica se aplica o máximo e o mínimo a fim de se obter o intervalo viável para essas condições. Essa informação é atualizada para o algoritmo a ser aplicado (também mencionado, em maiores detalhes, na seção 3.1.1.2.).

Existem reações cujo intervalo se torna uma restrição de igualdade. Na prática, essas reações se tornam artefatos no problema de otimização e, geralmente, $0 \leq v_i \leq 0$. Nesses casos é possível eliminar a reação da matriz estequiométrica, dado que não existe fluxo reacional e sua existência é indiferente para o resultado final (KIM *et al.*, 2011). Essas reações são referidas como reações bloqueadas, dado que não podem assumir fluxo metabólico.

A.3 Restrições TIPO II

Nesse caso as análises preliminares se reduzem aos limites de reação. Informações acerca desses limites podem ser obtidas de diversas formas, tanto *in silico* quanto *in vivo*. Essas informações são incorporadas no modelo antes de se aplicar um algoritmo proposto.

A.4 FVA – TIPO II

De forma similar a aplicação anterior, se realiza o mesmo algoritmo, porém com ou sem a adição de mais restrição acerca de um fluxo objetivo. Dessa forma é possível obter intervalos iguais ou menores aos anteriormente propostos. Esses resultados são atualizados na restrição dos limites reacionais ($LB \leq v \leq UB$).

A.5 Termodinâmica

Alguns fluxos obtidos por FBA, por exemplo, não são termodinamicamente possíveis (apesar de serem fisicamente possíveis), sendo assim, esses não deveriam ser investigados ao se aplicar um dado algoritmo. Nesses casos é possível propor análises preliminares para reduzir os limites de reação (em alguns casos, transformando reações reversíveis em irreversíveis, ou ainda alterando a direção das reações irreversíveis).

É válido ressaltar que essas análises, geralmente, fazem uso da energia livre de Gibbs para verificar se a reação é termodinamicamente provável ou não. No entanto, como mencionado anteriormente, as condições físico-químicas (e.g., pH, força iônica e concentrações), no ambiente intracelular, provavelmente são diferentes, ou então de difícil mensuração (SOH e HATZIMANIKATIS, 2010). Nesse sentido, existe uma limitação tecnológica para obtenção de resultados de qualidade, tal qual existe para modelos cinéticos (conforme mencionado na seção 3.1.1. Fluxômica).

Existem duas grandes desvantagens nessa abordagem: (i) como mencionado, a aquisição de dados de qualidade é de extrema dificuldade, muitas vezes substituída por valores considerados razoáveis (SUN *et al.*, 2020). Sendo assim, as restrições não são classificadas como “duras”, ou seja, pequenas variações podem ser plausíveis. Logo, esse tipo de abordagem pode se tornar redundante. (ii) As restrições adicionais podem implicar em um sistema sem solução dado outro conjunto de restrições (e.g., restrições termodinâmicas junto às restrições GPR).

Dado que não é de o escopo desse manuscrito discutir algoritmos relacionados a termodinâmica, são indicados apenas alguns com essa ambição: *Thermodynamic FBA* (HENRY *et al.*, 2007), *Min-max Driven Force* (NOOR *et al.*, 2014), *OptMDFpathway* (HADICKE *et al.*, 2018).

A.6 Ensaios empíricos

A partir de dados de cultivos anteriores a aplicação do algoritmo, é possível sugerir alguns limites de reação. É válido ressaltar que a aquisição desse tipo de informação é onerosa e demanda diversos ensaios (como mencionado na seção 3.1.1. Fluxômica).

Muito embora seja possível usar de informações empíricas, existem pesquisadores que argumentam que dados ômicos, para o presente contexto, não apresentam melhora significativa nos resultados (MACHADO e HERRGÅRD, 2014). Isso se deve, principalmente, como esses dados são usados. Diminuir o intervalo reacional não altera a estratégia proposta nos algoritmos de biologia de sistemas de forma geral. Logo, a relação de recursos desembolsados para tal aquisição e benefícios oferecidos, constituem uma razão pouco benéfica.

A.7 GPR

O dogma central da biologia molecular, proposto por CRICK, 1970, apresenta uma relação linear entre DNA, RNA e proteínas. De forma resumida, a proposição clássica diz que o DNA pode ser convertido (por mecanismos celulares) a RNA, e o RNA a proteínas. Muito embora, no contexto atual, já se tenha demonstrado que existem situações ordinárias em que não necessariamente isso ocorre (MORANGE, 2009), o alicerce desse dogma é de suma importância para a associação de genes-proteínas-reação (GPR ou GPRA) usada no contexto de biologia de sistemas.

O DNA faz parte da estrutura dos cromossomos, uma sequência ordenada em uma região específica, que codifica um produto funcional. Essa região pode ser denotada como gene. O produto funcional desse gene, pode ser uma proteína com capacidade catalítica, no caso, uma enzima. Essa enzima, por sua vez, pode catalisar uma ou mais reações. A classificação da função de cada enzima nesse contexto (e.g., quinases, hidrolases) não é pertinente.

Na relação entre genes e proteínas do dogma proposto por Crick (um gene, uma proteína, uma função) apresenta controvérsias: (*i* – múltiplos genes formando uma única enzima) uma enzima não necessariamente é uma única proteína, a mesma pode ser composta por diversas proteínas (complexo enzimático). (*ii* – múltiplas enzimas que catalisam a mesma

reação) Existem isoenzimas, enzimas diferentes que são responsáveis pela(s) mesma(s) reação(-ões). (*iii* – múltiplas reações por uma enzima) Uma enzima pode aceitar diversos substratos, seja em seu sítio ativo ou alostérico (enzimas promiscuas). Também é possível que uma enzima tenha preferência por um substrato, porém na presença de algum similar, a mesma consegue catalisar a reação em velocidade reduzida.

No contexto de estimação de fluxos internos, GPR são informações adicionais que podem ser incorporadas ao espaço FS de diversas formas: (*i*) restrições booleanas, (*ii*) conversões dessas restrições booleanas em restrições, (*iii*) adição de reações artificiais, (*iv*) mudança na matriz estequiométrica.

É comum se referir a GPR como um tipo de regulação, essa regulação pode ser definida como a resposta metabólica, pela ativação ou repressão de genes, a presença de metabólitos (SHLOMI *et al.*, 2007). Porém, em algoritmos CSOM, a definição de regulação não é a mesma, e tampouco existe um consenso para tal. De forma geral, a regulação em CSOM se remete a diferença dos limites de fluxo reacional entre as condições selvagem e mutada.

Cada uma dessas estratégias possui vantagens e desvantagens, bem como podem alterar o tipo de problema (e.g., de LP para MILP, um problema cujas variáveis de otimização são contínuas e binárias). No entanto o objetivo final é o mesmo, obter melhores estimativas para os fluxos internos. Em algoritmos CSOM, a GPR é importante não somente para esse último fim, mas também para o contexto de deleções. Uma enzima pode catalisar outras reações, portanto, é notável que outras reações sejam beneficiadas (ou prejudicadas). Se a GPR não fosse considerada, apenas uma única reação seria beneficiada, e muitas vezes esse tipo de descrição não é adequada para o cenário real. Note-se ainda que técnicas de engenharia genética são menos onerosas de se aplicar em nível de gene quando comparado com proteína ou reação. Sendo assim, as associações GPR constituem um passo a mais entre a relação *in silico* e *in vivo*.

A.8 Restrições booleanas (CONVERT *et al.*, 2001)

Ambos os trabalhos de COVERT *et al.*, 2001 e COVERT e PALSSON, 2002, apresentam um problema dinâmico em que se considerou GPR como restrições booleanas puras. Considera-se que um gene G é inibido de ser transcrito pelo produto B (i.e., quando presente, impede a transcrição do gene). Considera-se ainda que esse gene G pode ser transcrito

em uma proteína E, que catalisa um substrato A para o produto B. Sendo assim, a transcrição somente ocorre “se G e não B”, assim como a reação somente é processada “se A e E”.

Aliada às (novas) restrições regulatórias, os autores também fizeram uso de FBA para estimar fluxos internos. Sendo assim, além de respeitar a região viável (conjunto FS), é necessário respeitar às restrições regulatórias. Essa condição é conhecida como *metabolic-regulatory steady state* (MRS).

Em ambos os trabalhos existe um estudo (experimental) preliminar que define quais são as expressões lógicas (a quais alvos a mesma incide), bem como em quais faixas temporais isso ocorre. Note-se que se uma enzima não foi detectada, então existe uma restrição para que o fluxo reacional referente não assuma valor diferente de zero.

Observa-se que existem algumas lacunas nessa abordagem:

(i - dependência de dados empíricos) Uma reação só pode ser descrita pelo modelo se a mesma foi detectada ou não em um estudo empírico.

(ii – qualitativo) O caráter desse tipo de abordagem é puramente qualitativo (i.e., ou a enzima é produzida ou então ela não é). Não existe nenhuma sugestão de unidade para avaliar o quanto gene G está sendo transcrito.

(iii – tamanho do modelo) Provavelmente pela data (2002), o modelo foi pequeno quando comparado aos genomas disponíveis na literatura (149 genes, 73 enzimas, 113 reações e apenas 16 proteínas regulatórias, enquanto um genoma de *E. coli* iAF1260 possui 1261 genes e 2382 reações (FEIST *et al.*, 2007)). A aplicação de metodologias similares a modelos em escala genômica não somente se torna onerosa, como também aumentaria significativamente a complexibilidade da representação da rede metabólica. Portanto, é uma abordagem mal escalonável.

(iv – implementação) Os autores sugeriram que fosse definido, antes da aplicação no modelo, quando essas relações estão ativas. Em outras palavras, é equivalente a assumir diversas variáveis binárias e atribuir restrições para que essas sejam iguais ao valor especificado. Assumir um valor especificado a priori elimina a capacidade preditiva do modelo em algumas condições (i.e., deleção, assimilação de outro substrato ou ainda apenas alterar a concentração dos presentes).

(v – estado estacionário) Essa abordagem estima os fluxos internos por meio de FBA, no entanto o mesmo considera estado pseudo-estacionário, enquanto a abordagem dos autores, claramente, assume uma dinâmica de concentrações no ambiente intracelular. Uma solução proposta é assumir o estado pseudo-estacionário para metabólitos escolhidos pelo experimentalista. Esse tipo de solução *ad hoc* apresenta uma espécie de arbitragem, o que

consequentemente, envia os resultados. Essa metodologia foi chamada de *regulatory Flux Balance Analysis* (rFBA) pelos autores.

A.9 Restrições booleanas representadas como inequações (SHLOMI *et al.*, 2007)

Uma continuidade natural seria propor inequações que representassem as associações lógicas que modelam a GPR. Partindo de um trabalho posterior de COVERT *et al.*, 2004, SHLOMI *et al.*, 2007 propuseram um modelo capaz de considerar a MRS no FBA. Essa abordagem foi batizada pelo grupo como *Steady-state Regulatory Flux Balance Analysis* (SR-FBA).

Essa variação do FBA consiste em um MILP em que, além das premissas básicas, existem restrições que devem ser respeitadas em diferentes níveis hierárquicos (em forma de variáveis binárias): (i) regulação global, (ii) regulação entre genes e proteínas, (iii) regulação entre proteínas e reações e (iv) regulação baseada nos fluxos internos.

Em seu artigo original, a rede metabólica usada (assim como as restrições booleanas propostas) foram as mesmas estudadas por COVERT *et al.*, 2004. Que se trata de uma *E. coli* com 1010 genes, 817 proteínas, 1083 reações (933 internas e 150 externas) e 761 metabólitos. Note-se que um problema de FBA clássico possuiria 761 equações e 1083 variáveis, no entanto o SR-FBA, para esse caso, possui 7323 equações e 5380 variáveis (4296 são variáveis binárias). Esse problema, de acordo com os autores, levou menos de um segundo para ser resolvido (SHLOMI *et al.*, 2007).

Note-se que nesse caso, diferente do anterior, as variáveis binárias são, também, variáveis de otimização (e não especificadas a priori). Dessa forma o SR-FBA é ordens de magnitude mais complexo que o rFBA. A região viável do mesmo é a mesma (o conjunto *FS*) e as variáveis binárias (i.e., regulação) agem de forma a delimitar esse espaço pela MRS. Sendo assim, a inserção da GPR fornece um espaço vetorial mais restrito.

Semelhante ao seu antecessor, essa também possui algumas desvantagens:

(i - dependência de dados empíricos) Os dados obtidos para a construção das associações lógicas booleanas foram adquiridos de outros trabalhos (BOCHNER *et al.*, 2003; GLASNER *et al.*, 2003). Nesse caso em particular, foram usados 13750 fenótipos, adicionalmente, ainda se sugeriu a inspeção para novas interações regulatórias (i.e., os dados empíricos não continham todas as informações desejadas).

(ii – qualitativo) Em caráter similar a metodologia anterior, a mesma também é qualitativa.

(iii – tamanho do modelo) O modelo metabólico usado não foi genômico e, mesmo em dimensões pequenas, aumentou em mais de 6 vezes o número de variáveis de otimização. Para o contexto isolado de SR-FBA, o esforço computacional pode ser mais modesto, porém para a aplicação em algoritmos CSOM, essa estratégia pode ser proibitiva.

(iv – implementação) Esse algoritmo foi implementado no TIGER *toolbox* (JENSEN *et al.*, 2011), em que, nesse ambiente, é possível transformar associações lógicas genéricas em restrições. Porém a elaboração dos dados de entrada para tal (não considerando o esforço experimental para a aquisição de dados) ainda assim permanece onerosa. O arquivo de notação de COVERT *et al.*, 2004 possui uma anotação para cada gene (logo, 1010 linhas).

A.10 Restrições booleanas representadas como falsas reações (ZHANG *et al.*, 2015)

Outra opção viável além da inserção de restrições, é a modificação da matriz estequiométrica, e por conseguinte, do espaço nulo. Proposto por ZHANG *et al.*, 2015, *Logic Transformation Model* (LTM), é um algoritmo que traduz associações lógicas booleanas entre genes e enzimas em reações artificiais. Por exemplo: se um complexo enzimático é formado pelos genes G1 e G2, e esse primeiro catalisa a reação de A para B, então LTM converte esse sistema em um equivalente (que não condiz com a realidade) em que existe um intermediário entre A e B (i.e., uma reação em série). Esse intermediário representa a escolha por um outro algoritmo (e.g., FBA) para que os genes G1 e G2 sejam ativos. Em outro caso similar, em que existe uma enzima que pode ser sintetizada tanto pelo gene G1 ou pelo gene G2, existe uma proposta com duas reações em paralelo para cada um deles. Quaisquer combinações entre associações “e” e “ou” podem ser incorporados no LTM.

Note-se que, por essa abordagem, se torna dispensável o uso de variáveis binárias. Logo, apesar de também aumentar o número de variáveis, essa abordagem se torna computacionalmente menos custosa, dado que solucionar um LP (de maiores dimensões), tem de ser menos oneroso que solucionar um MILP com diversas variáveis binárias e menos variáveis contínuas. Isso se deve pois o primeiro não gera explosão combinatória. Adicionalmente, a aplicação do LTM depende de uma anotação de qualidade do GEM e não de dados empíricos de cultivo, como é o caso de seus dois antecessores.

No entanto, ainda existem pontos falhos:

(ii – qualitativo) Existe um aumento substancial do número de metabólitos e reações, no entanto, as (pseudo-)reações apresentam apenas a escolha do algoritmo por um determinado conjunto de genes. O resultado, assim como observado pelos autores, é o mesmo de um FBA comum. Na prática, o algoritmo proposto não apresenta formas de mensurar o quanto um gene é mais expresso que outro ou ainda comparar se um gene G é mais ou menos expresso em condições diferentes. Por fim, LTM sintetiza somente um observador de quais genes estão ativos ou não naquele dado fenótipo.

(iii – tamanho do modelo) Os autores fizeram uso do genoma de *E. coli* iAF1260, em que, no modelo estendido, se obtiveram 7287 reações (um pouco mais de 3 vezes mais que o original) e 5372 (um pouco mais de 3,2 vezes mais que o original). Logo, além do ganho de não usar variáveis binárias, o número bruto de variáveis de otimização foi, pelo menos, metade quando comparado com SR-FBA.

(iv – implementação) A implementação das associações lógicas ainda permanece onerosa, é necessário especificar um arquivo de entrada com essas informações. É válido ressaltar que, como apresenta o trabalho de TÜRKAY e GROSSMANN, 1996, é possível representar associações lógicas condicionais (se...então) e bi condicionais (se e somente se) por combinações equivalentes de conjunção (e) e disjunção (ou).

(v – nuances de pós-processamento) Não investigado pelos autores, a não unicidade do perfil dos fluxos internos gerada pela resolução de LP's (e.g., FBA), pode ofuscar análises de pós-processamento. Por exemplo: Se uma enzima, que catalisa uma dada reação, possui relação disjuntiva entre dois genes, que participam da reação de biomassa, tanto faz qual gene é escolhido, haja vista que o fluxo líquido do FBA comum é respeitado. No contexto de CSOM, essa relação pode não ser investigada e, portanto, resultados ótimos (ou subótimos) de interesse, podem não ser considerados. Por fim, assumido pelos autores a fim de se obter o mesmo resultado que o FBA, não existem garantias de que os pseudometabólitos respeitem o estado pseudo-estacionário. Adicionalmente, o algoritmo considera o custo entre a transcrição e tradução entre genes igual (o que pode ser facilmente alterado dentro da mesma metodologia com informações adicionais). Por exemplo: se um dado complexo enzimático necessita de 12 subunidades de um dado gene, enquanto uma enzima, que catalisa a mesma reação, precisa de menos subunidades que seu “concorrente”, logo a segunda tende a ser mais benéfica. Esse tipo de informação não é incorporado no modelo.

A.11 Restrições booleanas representadas como expansão da matriz estequiométrica (MACHADO *et al.*, 2016)

A abordagem apresentada por MACHADO *et al.*, 2016 é similar a proposta do LTM, em que se considera uma mudança na matriz estequiométrica. Nesse caso a matriz estequiométrica expandida é tal que:

$$\mathbf{S}^{Aug} = \begin{bmatrix} \mathbf{S} & \mathbf{0} \\ \mathbf{S}^{GPR} & \mathbf{E}^{Sub} \end{bmatrix} \quad (85)$$

Diferente da abordagem anterior, a rede metabólica não é alterada, porém a estrutura da matriz estequiométrica sim. \mathbf{S}^{Aug} é a matriz estequiométrica com informações da rede metabólica original (\mathbf{S}), das relações GPR (\mathbf{S}^{GPR}) e do uso enzimático (\mathbf{E}^{Sub}). Existe um aumento do número de variáveis, assim como nas outras abordagens. Para cada gene que é sabida a relação GPR existe uma linha a mais, assim como para cada enzima existe uma coluna a mais, na matriz estequiométrica expandida (\mathbf{S}^{Aug}). Sendo assim, o vetor das variáveis é composto pelo vetor dos fluxos reacionais e pelo vetor dos fluxos enzimáticos.

Note-se que \mathbf{S}^{GPR} descreve informações entre enzimas e reações: (i) se uma enzima catalisa uma única reação. (ii) Se é uma isoenzima, e, portanto, existe mais de uma enzima que catalisa uma reação em particular. (iii) Se é uma enzima promíscua, e catalisa mais de uma reação ao mesmo tempo. (iv) Se é um complexo enzimático, e mais de uma enzima catalisa uma única reação. Observa-se que a matriz \mathbf{E}^{Sub} simboliza quantas proteínas são produzidas para desempenhar a função biológica. Os autores escolheram a base canônica para representar essa relação. O balanço de massa, nesse caso, ainda deve obedecer ao estado pseudo-estacionário.

A.11.1 Parsimonious Flux Balance Analysis (pFBA).

Essa estratégia de incorporação de genes, diferente do LTM, não se comparou com o FBA comum, mas sim com o *parsimonious Flux Balance Analysis* (pFBA). Nessa abordagem procura-se diminuir o custo enzimático, dado que o mesmo não é considerado (e não foi em nenhuma das abordagens). Em outras palavras, se explora o espaço viável do perfil dos fluxos

internos (já mencionado ser não único), de forma a se obter o valor que possui menor custo enzimático.

Proposto inicialmente por LEWIS *et al.*, 2010, o pFBA é solucionado em duas partes: (i) FBA comum, a fim de se obter o máximo teórico. (ii) Com o resultado da simulação anterior, se aplica uma restrição adicional, o fluxo de reação de formação de biomassa é fixado no valor máximo teórico). A função objetivo também é alterada, substituída pela minimização da soma de todos os elementos do vetor dos fluxos reacionais. Em outras palavras, a condição em que a biomassa atinge seu máximo teórico, porém com o menor custo possível.

$$\begin{array}{ll}
 \min & \mathbf{1}^t \mathbf{v} \\
 \mathbf{v} & \\
 \text{s. t.} & \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0} \\
 & \mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB} \\
 & \mathbf{v} \in \mathbb{R}^n
 \end{array} \quad (86)$$

Em que $LB_{bio} \leq v_{bio} \leq UB_{bio}$ está implícito em $\mathbf{LB} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{UB}$ de forma que $UB_{bio} = LB_{bio} = \bar{v}_{bio}$. Esse último é o valor ótimo obtido por um problema de FBA genérico. É notável que, nesse caso, $\mathbf{LB} \geq \mathbf{0}$. A fim de contemplar essa restrição, é comum que as reações reversíveis sejam decompostas em 2 irreversíveis, ambas positivas ou iguais a zero.

Do ponto de vista biológico, existem trabalhos que corroboram para essa argumentação (IBARRA *et al.*, 2002; FONG *et al.*, 2003; SCHUETZ *et al.*, 2007), no entanto também existem trabalhos que demonstram que essa condição nem sempre é respeitada (TEUSINK *et al.*, 2006; SCHUSTER *et al.*, 2008). Um exemplo prático é apresentado por MOLENAAR *et al.*, 2009, em que é possível verificar que o metabolismo celular as vezes não caminha para a otimização de recursos energéticos, principalmente em cepas mutadas.

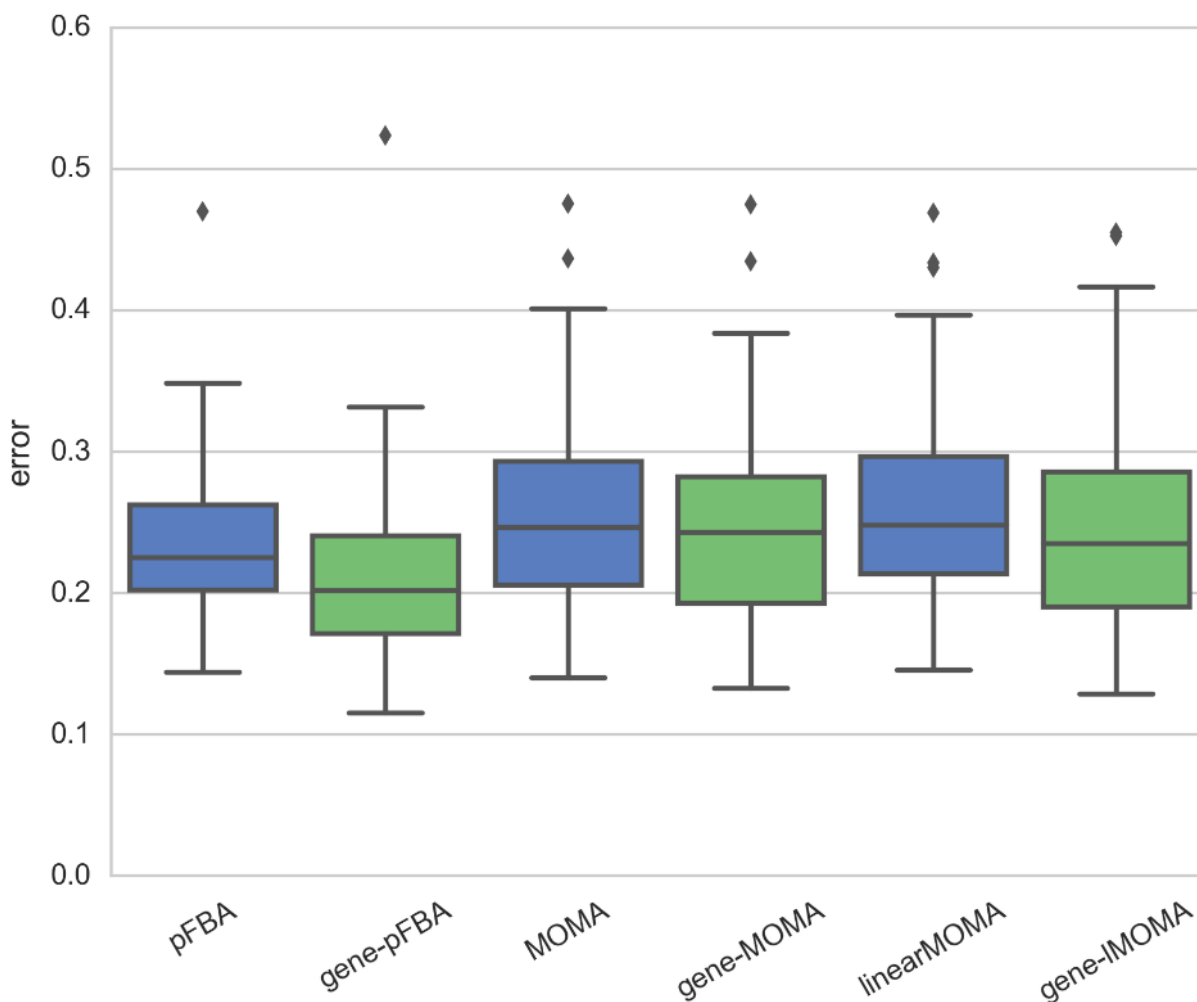
A.11.2 Comparações (MACHADO *et al.*, 2016)

Os autores propuseram uma alternativa ao pFBA, o gene-pFBA, com uma alteração singela. Ao invés de considerar a minimização da soma de cada elemento do vetor dos fluxos reacionais, se considera os fluxos enzimáticos. Dessa forma a análise se encontra no nível enzimático ao invés do reacional, muito embora o fluxo máximo teórico ainda seja considerado em nível reacional.

Não obstante, uma formulação similar foi proposta para o MOMA, o gene-MOMA, em que o fluxo reacional foi substituído pelo fluxo enzimático na função objetivo. Alterações na

norma do MOMA também foram sugeridas, no caso da linear foi chamado de linearMOMA, quando considerado o vetor dos fluxos enzimáticos, gene-IMOMA. Adicionalmente, o fluxo de referência (i.e., fluxo da cepa selvagem), está igualmente em nível enzimático. A Figura 8 apresenta os principais resultados para essas métricas (MACHADO *et al.*, 2016):

Figura 8 - Comparação da predição dos fluxos internos em nível de reação e proteínas



Fonte: MACHADO *et al.*, 2016

Comparando os resultados da distribuição da predição do erro normalizado (Figura 8) é possível verificar que os resultados obtidos por ferramentas em nível enzimático obtiveram os melhores resultados.

Os autores fizeram uso do modelo em escala genômica de *E. coli* iAF1260 (FEIST *et al.*, 2007) para todos os cálculos. Note-se ainda que 16% das enzimas são complexos enzimáticos (com até 13 subunidades), em que cada subunidade é comum em outros complexos enzimáticos. Cerca de 31% das reações são catalisadas por isoenzimas (até 7) e 72% das reações são catalisadas por enzimas promiscuas. O erro considerado foi a norma l^1 do percentual

relativo ao fluxo experimental (ISHII *et al.*, 2007). Os fluxos experimentais contemplam 24 ensaios, cujo cada um deles possui uma única deleção.

A.11.3 Pontos positivos e negativos

A estratégia apresentada para representação da rede metabólica é a que mais concentra pontos positivos das apresentadas:

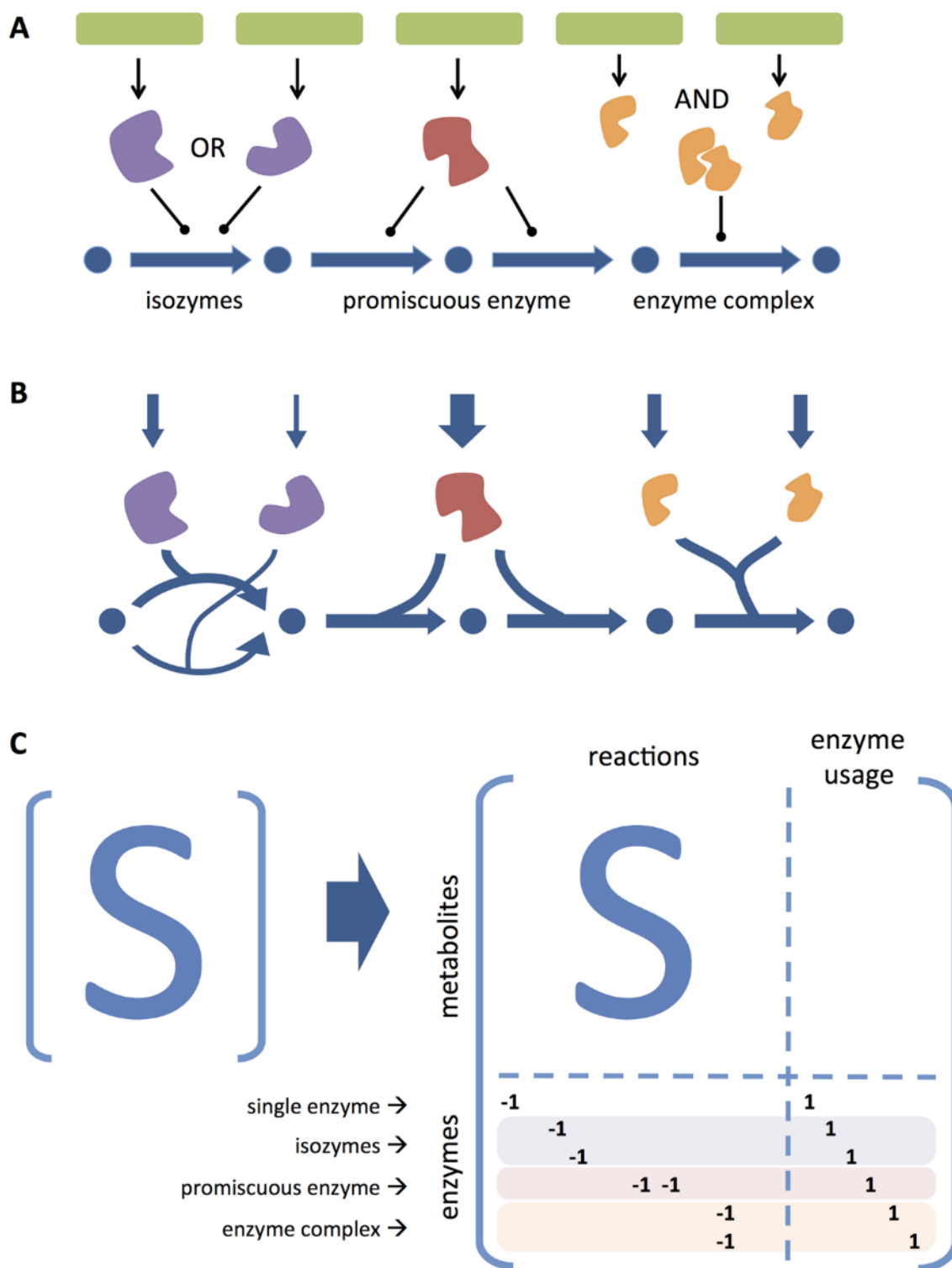
(i) Condensa toda a informação GPR na matriz estequiométrica sem a necessidade de usar variáveis binárias (tampouco sugerir novas restrições).

(ii) O aumento de variáveis e equações não foi expressivo quando comparado com as técnicas anteriores. O modelo de *E. coli* iAF1260 foi reduzido (segundo os autores, considerando FVA em condições de crescimento aeróbias e meio de glicose mínimo), resultando em 914 genes, 1532 reações e 1032 metabólitos. Após a incorporação das GPR foram obtidas 3853 reações (um pouco mais de 2,5 vezes) e 1946 metabólitos (um pouco mais de 1,8 vezes). No nível reacional, considerando somente a matriz estequiométrica original, houve um aumento de mais de 50% devido a classificação de isoenzima.

(iii) A aplicação em modelos CSOM é de fácil assimilação, diferentes das estratégias anteriores. Atualizar a representação da matriz estequiométrica (e por conseguinte das variáveis de otimização), é mais acessível do que alterar do tipo de problema (i.e. de um LP para um MILP) e/ou, adicionalmente, aumentar o (excessivamente) o número de variáveis.

No entanto, ainda assim, existem pontos negativos: (ii – qualitativo) a estratégia sugerida propõe uma relação direta entre proteínas e reações, mas não entre genes e proteínas, tampouco é possível estender o mesmo raciocínio, caso fosse considerada a dinâmica do bioprocessamento, para a relação entre reações e genes (e.g., inibição por substrato ou produto). Adicionalmente, uma falha reportada pelos autores é a ausência de informações sobre o número de cópias de subunidades para cada enzima em GEMs. No entanto, caso essas estivessem disponíveis, seria de fácil assimilação pela estratégia proposta.

Figura 9 – Exemplificação da estratégia proposta



Fonte: MACHADO *et al.*, 2016

Um ponto importante a ser ressaltado é a classificação de enzimas e como isso é descrito matematicamente. A Figura 9 apresenta (A) como as enzimas são classificadas. No primeiro caso, isoenzimas, duas enzimas (ou mais) catalisam a mesma reação individualmente. No segundo caso, enzimas promíscuas, uma enzima catalisa mais de uma reação (podendo ser,

inclusive, em seu sítio alostérico). No terceiro caso, complexo enzimático, várias proteínas, em conjunto, possuem capacidade catalítica (formando uma enzima), e essa, por sua vez, catalisa uma dada reação. É possível ver exemplo práticos disso em (B), ou seja, como os níveis GPR estão atrelados. Já em (C) é possível verificar uma comparação da representação da matriz estequiométrica canônica com a nova proposta.

Note-se que, em isoenzimas, se seguido o proposto em (C), as colunas que possuem coeficientes diferentes de zero, para esse tipo de enzima, devem ser idênticas no nível de reações. Isto se deve pois isoenzimas catalisam a mesma reação, sendo assim, aumentaria o número de variáveis (além de considerar somente reações irreversíveis, também mencionado pelos autores). Uma consequência imediata dessa abordagem é o aumento da dimensão do espaço nulo da matriz estequiométrica, adicionalmente, pela forma como isso é feito, abre um precedente para como deveria ser feita essa escolha (i.e., quais, e em que proporção, as isoenzimas devem ser escolhidas). Esse problema é parcialmente resolvido pela função objetivo do gene-pFBA sugerido, muito embora ainda exista uma região viável a ser explorada.

A.11.4 Sugestões

A estratégia apresentada por MACHADO *et al.*, 2016 para representar matematicamente as GPR é a melhor quando comparada com as demais. A revisão nessa área não encontrou outras metodologias mais interessantes que a presente. No entanto, a fim de sugerir uma forma de classificar as enzimas (i.e., isoenzimas, enzimas promíscuas e complexos enzimáticos) na matriz \mathbf{S}^{GPR} , os autores penalizam a matriz estequiométrica (\mathbf{S}) de forma a aumentar o número de reações.

Essa estratégia não reflete a realidade, uma vez que isso abre precedente para que algoritmos em biologia de sistemas procurem em nível reacional uma redundância presente no nível enzimático. Em outras palavras, o aumento da dimensão do espaço nulo deveria estar atrelado ao nível enzimático, no entanto, dessa forma, a estrutura da matriz estequiométrica expandida (\mathbf{S}^{Aug}) seria totalmente alterada. (i) A matriz que representa as GPR, \mathbf{S}^{GPR} , perderia a propriedade de rotulação de enzimas, não poderia ser possível identificar uma isoenzima de uma enzima promíscua. (ii) A matriz que reflete o uso das enzimas, \mathbf{E}^{Sub} , não seria uma base completa, e sim incompleta, dessa forma, a matriz conteria informações de redundância que

estavam presentes na matriz estequiométrica na estrutura inicialmente sugerida. Um problema atrelado a essa sugestão é sugerir como esse poliedro seria definido com base no GEM.

A abordagem proposta pelos autores não contempla a relação entre genes e enzimas. Adicionalmente, podem existir, mesmo em bactérias, redundância no nível dos genes, sendo assim, o mesmo também poderia ser representado por um poliedro. Ambas as representações das relações entre gene e enzimas (não abordada) e de enzimas e reações podem ser mais bem descritas com resultados empíricos. Se os mesmos fossem utilizados dessa forma, supõe-se que haveria maior ganho, do que apenas restringir mais o espaço nulo da matriz estequiométrica.

Em eucariotos a existência de redundância no nível dos genes pode ser facilmente confirmada pelo *splicing* alternativo (KELEMEN *et al.*, 2013). Dessa forma a representação das GPR's se tornaria ainda mais complexa.

Embora esse tópico seja consideravelmente importante para implementação *in vivo* do resultado de um algoritmo CSOM, formas de melhorar a representação das GPR's não são abordadas no presente manuscrito. Adicionalmente, relações no nível entre genes e enzimas e entre genes e reações dificilmente são descritos no GEM e podem demandar dados empíricos. Sendo assim, a dificuldade não está em sugerir abordagens com maior qualidade, e sim adquirir esse tipo de dado.

APÊNDICE B – DEMAIS CSOM-MP-K

B.1 OptGeneKnock (ZHANG et al., 2015)

O algoritmo proposto por ZHANG *et al.*, 2015 é proposto em conjunto com o *Logic Transformation Model* (LTM), uma forma de abordar as associações de Gene-Proteína-Reação (GPR), que foi explanado em detalhes em no Apêndice A. Sucintamente, OptGeneKnock possui as mesmas ambições que o OptKnock, porém com a adição da funcionalidade LTM.

Note-se que, como mencionado no Apêndice A, um FBA implementado com LTM e um FBA comum produzem o mesmo resultado. No entanto, no contexto de CSOM, LTM obriga o algoritmo a deletar uma reação a “nível genético”. A última afirmação vem em destaque, pois LTM apresenta pseudo-reações que traduzem relações booleanas (que representam as GPR). Sendo assim, ao se deletar uma reação, essas relações vêm à tona e obrigam outras deleções (quando necessário). Salienta-se que o modelo usado pelo algoritmo foi o de *E. coli* iAF1260, que, após a implementação do LTM se obtiveram 7287 reações (um pouco mais de 3 vezes mais que o original) e 5372 (um pouco mais de 3,2 vezes mais que o original).

A formulação (não apresentada) do OptGeneKnock, similar ao OptKnock, constitui um MILP de dois níveis, porém com algumas restrições a mais, a fim de incorporar o LTM. A bilinearidade do mesmo é solucionada de forma similar ao OptKnock (índice *i* do Anexo D) Adicionalmente, o problema é convertido em um MILP de único nível e solucionado por outro algoritmo chamado *Genetic Design through Branch and Bound* (GDBB) (EGEN e LUN, 2012). Muito embora ZHANG *et al.*, 2015 tenham mencionado esse estudo, como algoritmo para converter um MILP de dois níveis em um único nível, o OptGeneKnock se baseia a mesma metodologia que a usada no OptKnock.

Os autores constataram que nenhuma das aplicações do OptGeneKnock ultrapassaram 1h de simulação. No entanto o algoritmo usado para resolver o MILP foi o GDBB, um *solver* heurístico, que não garante que o resultado ótimo obtido seja de fato o global. Muito embora seja possível implementar o mesmo algoritmo e usar outro *solver*. Esse algoritmo, assim como outros, tentam trocar qualidade do resultado por um tempo computacional mais modesto.

Os autores optaram por um *solver* heurístico, provavelmente, pela dimensão do problema ter aumentado substancialmente (3 vezes mais variáveis) e, como mencionado, a

explosão combinatória cresce exponencialmente com o número de variáveis. Adicionalmente, como apresentado em 3.1.5.1.1 OptKnock Reformulado (CHOWDHURY et al., 2015), o número de intervenções incrementa o tempo computacional por uma exponencial cúbica. No presente caso foram realizadas, no máximo, 5 deleções (em nível genético), que, devido a LTM, resultaram em 17 e 20 deleções (em nível reacional) para etanol e succinato respectivamente.

B.2 egKnock (XU, 2019)

Do mesmo autor do ReacKnock, o presente algoritmo propõe realizar deleções a fim de maximizar um fluxo objetivo, assim como o primeiro. No entanto, o diferencial da proposta se concentra em incorporar as GPR, assim como foi mencionado no Apêndice A. O autor cita que a TIGER *toolbox* (JENSEN et al., 2011) foi usada na implementação do mesmo. Existem algumas propostas de melhora no algoritmo, essas fazem com que o mesmo destoe da primeira proposta de XU et al., 2013. O presente artigo é um *pré-print* e não foi revisado por pares.

Houve uma mudança controversa no presente algoritmo (com relação ao ReacKnock), ao invés de se considerar a maximização da biomassa, a mesma foi fixa em seu valor ótimo (i.e., $\mathbf{c}^t(\mathbf{v} - \bar{\mathbf{v}}) = 0$, em que \mathbf{c} é um vetor cujo único valor não nulo é o elemento da função objetivo biológica, que é unitário). E, no lugar dessa função objetivo, se minimizou a função objetivo industrial. Note-se que no nível externo a função objetivo permanece inalterada: maximização da função objetivo industrial.

Em outras palavras, salvo por mudanças singelas no algoritmo que converte o MILP de dois níveis um MILP de um único nível, o egKnock tenta captar o diferencial do RobustKnock. Dessa forma, o resultado obtido tende a ser menos otimista e mais realista caso uma mutação venha de fato a ser realizada *in vivo*. A primeira mudança mencionada pode ser classificada como “controversa”, pois obter um máximo teórico para a formação de soa, no mínimo, otimista. O autor poderia fixar uma porcentagem do valor de formação de biomassa como valor mínimo (e.g., 80% do valor da biomassa), porém esse parâmetro seria totalmente arbitrário. Adicionalmente, diferente da proposta do ReacKnock, fixar um valor de máximo teórico significa fixar uma região da topologia (independente das deleções). Em outras palavras, mesmo com deleções, o máximo teórico biológico da cepa selvagem nunca poderá diminuir abaixo desse dado valor, o que não ocorre no ReacKnock.

Resumidamente, o algoritmo propõe minimizar o desvio entre o mínimo e máximo teórico do fluxo objetivo industrial, no entanto, fixando o máximo teórico da função objetivo biológica na condição selvagem. Ao propor essa última restrição entende-se que o fluxo reacional de carbono que aumenta o fluxo objetivo é redirecionado de outras partes do metabolismo que não o relacionado com a formação de biomassa. Note-se que isso somente é possível se o fluxo objetivo industrial for parcialmente acoplado com o fluxo objetivo biológico.

De forma similar ao ReacKnock, cepas alternativas são exploradas com cortes de Bender Combinatório. O algoritmo usou o modelo de *E. coli* iAF1260 e foi implementado em MATLAB. Informações sobre o *solver* usado não foram mencionadas pelo autor.

B.3 gcOpt (ALTER e EBERT, 2019)

O presente algoritmo é muito similar ao algoritmo anterior, egKnock, que não se considerou as GPR. Apesar da proposta de minimizar o desvio do fluxo objetivo industrial, sob a restrição de fluxo objetivo biológico máximo, o objetivo do algoritmo é estudar o acoplamento entre formação de biomassa e fluxo objetivo industrial (diversas reações).

Na perspectiva dos autores, forte acoplamento entre fluxo objetivo industrial e biológico está para uma alta produção do primeiro independente da produção do segundo (o contrário do argumento no presente manuscrito). Uma das principais conclusões, segundo o estudo *in silico*, conduzido pelos pesquisadores, é que, sob a hipótese de crescimento máximo teórico, os valores permitidos para a função objetivo industrial se resumem a um ponto. Note-se que o RobustKnock propõe a mesma coisa (porém com outra formulação matemática) que o presente algoritmo: maximizar o fluxo objetivo industrial mínimo.

Dadas as condições corretas, a topologia resultante desse MILP de dois níveis (no caso do gcOpt), de fato pode ser um único ponto (ótimo forte), no entanto, no contexto de biologia de sistemas, um ótimo forte não é coincidência. GEMs são conhecidos pela sua redundância e, sendo assim, torna-se uma tarefa difícil obter um ótimo único.

Adicionalmente, dado que o estudo propõe estudar acoplamento com a função objetivo biológica, é curioso fixar a formação de biomassa no máximo teórico (da cepa selvagem, i.e., maior valor possível). Na prática, isso obriga o algoritmo a redirecionar o fluxo reacional de outras regiões do metabolismo, que não a formação de biomassa. Como resultado esperado se

tem um incremento da função objetivo industrial sem perda da formação de biomassa. Logo, é plausível que quase todos os resultados apresentem acoplamento forte.

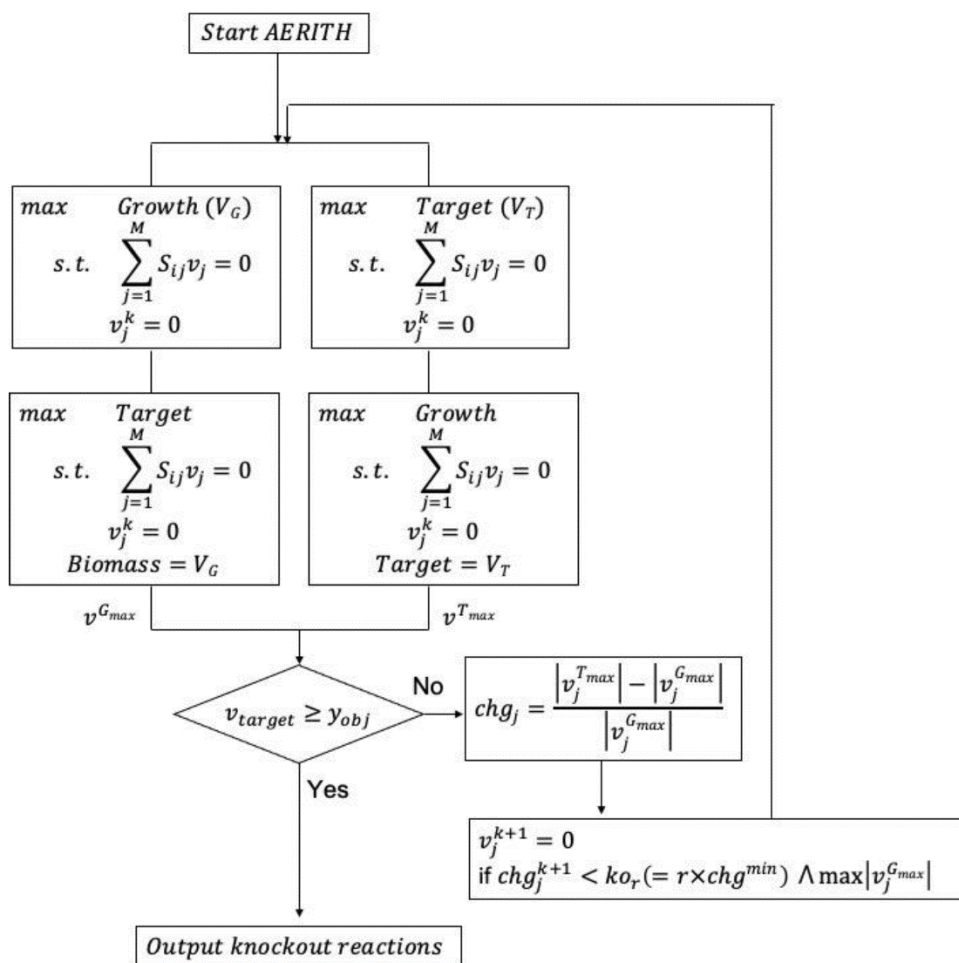
Por fim, os autores não propõem nenhum modelo de associações GPR, sendo todo o estudo conduzido em nível reacional. Note-se que o fenômeno biológico a ser estudado ocorre em um grau hierárquico mais complexo, sendo extremamente dependente dos outros dois níveis não estudados.

Quanto a estrutura do modelo, tem-se um MILP de dois níveis com um dado valor obtido por FBA (fluxo máximo teórico da formação de biomassa), sendo assim a abordagem também pode ser vista como sequencial. Os autores não apresentam os cálculos para a conversão de um MILP de dois níveis em um único nível, porém mencionam o procedimento proposto em BURGARD e MARANAS, 2003. Quanto a bilinearidade, não foi informado pelos autores. O MILP de um único nível resultante foi solucionado no ambiente MATLAB pelo *solver* Gurobi. O modelo usado foi o *iJO1366* de *E. coli* K-12 MG1655 (ORTH *et al.*, 2011), que contém 1366 genes (+8%), 2251 reações (−6,5%) e 1136 metabólitos (−31,9%), variando, de acordo com os percentuais em parênteses, quando comparado ao modelo de *E. coli* *iAF1260*. Muito embora o modelo atual (atualizado pela última vez em 2019, hospedado em <http://bigg.ucsd.edu/models/iJO1366>), esteja maior que ambos.

B.4 AERITH (SHIRAI e KONDO, 2022)

Como mencionado anteriormente, o objetivo de um MILP de dois níveis é impedir que seja necessário avaliar o máximo teórico da função objetivo biológica diversas vezes, o que, em alguns casos, pode ocasionar uma explosão combinatória ainda maior que a gerada por um MILP. O algoritmo AERITH procura otimizar esse processo ao sequenciar a abordagem canônica. Obtém-se dois LP de único nível em sequência (o segundo apresenta uma restrição de igualdade contendo o resultado do primeiro), um para a função objetivo biológica e outro para industrial. A Figura 10 ilustra como o algoritmo atinge tal tarefa:

Figura 10 - Ilustração do algoritmo AERITH



Fonte: SHINRAI e KONDO, 2022

Matematicamente, o algoritmo resolve primeiro, em paralelo, duas sequências de LP: a primeira delas estima o fluxo máximo teórico de formação de biomassa, que é fixado como restrição no segundo LP. Esse, agora, estima o máximo teórico do fluxo objetivo industrial (v^{Gmax}). O mesmo processo é realizado, em ordem inversa, para a segunda sequência de LP, o fluxo objetivo industrial é estimado e depois o fluxo objetivo biológico (v^{Tmax}). Note-se que em ambas as sequências paralelas ocorre uma deleção, em alvos pré-definidos, no k -ésimo candidato. Caso uma dada condição arbitrária seja cumprida ($v_{target} \geq y_{obj}$, i.e., o fluxo objetivo industrial deve atingir, no mínimo, o valor desejado) o algoritmo cessa. Caso contrário, o próximo alvo é deletado se a métrica escolhida ($chg_j^{k+1} < r \cdot chg^{min}$ ou módulo do maior valor de v_j^{Gmax} , em que j representa uma dada reação) for respeitada.

Note-se alguns pontos desse algoritmo:

(i) A ordem dos alvos importa, é razoável propor que uma deleção possui efeito sinérgico com uma outra, podendo abrir o precedente para múltiplos resultados possíveis com

um número diferente de deleções. Para se explorar isso é necessário reiniciar o algoritmo diversas vezes com um vetor de alvos possíveis embaralhado e ainda assim não explorar todo cenário possível. Observa-se que esse é um agravante para a explosão combinatória.

(ii) Uma consequência do ponto anterior é não explorar todo o espaço viável possível, o que pode desprezar alguns resultados desejados.

(iii) Não existe nenhum algoritmo de pós-processamento para avaliar resultados alternativos.

(iv) Não existe garantias de que a condição de parada ($v_{target} \geq y_{obj}$) seja respeitada, tampouco referência para y_{obj} . Como reportado no OptKnock, com uma redução de 18% na formação de biomassa, obteve um aumento de mais de 8.816% na formação de succinato (BURGARD *et al.*, 2003). Um aumento de quase 9.000% parece utópico, no entanto a métrica foi atingida somente com uma deleção.

(v) A métrica usada para decisão de deleção é totalmente arbitrária e não possui nenhum significado biológico real.

(vi) Por fim, em algoritmos CSOM, uma das principais preocupações é se de fato o microrganismo mutado atingirá uma produção máxima similar àquela obtida *in silico*. O presente algoritmo não possui ferramentas, ou sugestões, para se realizar isso.

Os resultados obtidos pelos autores foram positivos, no entanto o mesmo foi comparado com o GDBB (EGEN e LUN, 2012). É válido ressaltar que esse algoritmo é heurístico e, devido sua natureza, não é possível garantir que o resultado obtido é de fato ótimo. A AERITH foi implementada em MATLAB e o modelo usado foi de *E. coli* iJO1366, sendo esse o mais atual, com 1367 genes (+8,4%), 2583 reações (+8,4%) e 1805 metabólitos (+8,2%), variando, de acordo com os percentuais em parênteses, quando comparado ao modelo de *E. coli* iAF1260.