



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0713409-6 A2**

(22) Data de Depósito: 01/06/2007
(43) Data da Publicação: 27/03/2012
(RPI 2151)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 7/06

(54) Título: MÉTODO DE CONTROLE DE METABOLISMO DE LACTOBACILOS EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL; MÉTODO DE ERRADICAÇÃO DE LACTOBACILOS EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL; E MÉTODO DE CONTROLE DE MICROORGANISMOS INDESEJADOS NA PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

(30) Prioridade Unionista: 13/06/2006 US 812,965

(73) Titular(es): Phibro Animal Health Corporation

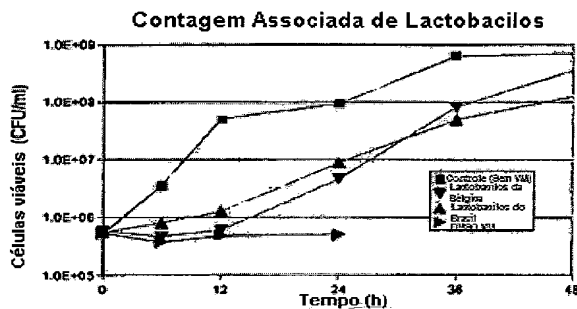
(72) Inventor(es): Dennis P. Bayrock

(74) Procurador(es): Trench Rossi e Watanabe Advogados

(86) Pedido Internacional: PCT US2007012999 de 01/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/145858 de 21/12/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE CONTROLE DE METABOLISMO DE LACTOBACILOS EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL; MÉTODO DE ERRADICAÇÃO DE LACTOBACILOS EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL; E MÉTODO DE CONTROLE DE MICROORGANISMOS INDESEJADOS NA PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL. Trata-se de um método para o controle de microorganismos tal como metabolismo de lactobacilos em pasta em uma instalação de produção de etanol, que inclui a adição à pasta, de uma quantidade eficaz para o controle desses microorganismos de um ou mais agente(s) antimicrobiano(s) do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel(eis) em água, um agente antimicrobiano com ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água, ou ambos, sendo que o termo "substancialmente insolúvel em água" significa que o agente antimicrobiano possui uma solubilidade em água pura a 20°C de 0,1 g por litro ou menos, sendo que, pelo menos uma parte do(s) agente(s) antimicrobiano(s) substancialmente insolúvel(l, eis) é adicionada para a pasta na forma de: 1) um líquido orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico com o(s) referido(s) agente(s) antimicrobiano(s) substancialmente insolúvel(l, eis) em água aí dissolvido(s), esse líquido orgânico compreendendo vantajosamente, mais do que 1 g por litro do(s) referido(s) agente(s) antimicrobiano(s); 2) partículas compostas do(s) referido(s) agente(s) antimicrobiano(s) substancialmente insolúvel(eis) em água com um diâmetro médio ponderal inferior a 5 µ; ou 3) ambos os itens supra.





PI0713409--6

"MÉTODO DE CONTROLE DE METABOLISMO DE LACTOBACILOS
EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL; MÉTODO DE
ERRADICAÇÃO DE LACTOBACILOS EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE
PRODUÇÃO DE ETANOL; E MÉTODO DE CONTROLE DE MICROORGANISMOS
5 INDESEJADOS NA PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE
ETANOL"

Este pedido reivindica prioridade do pedido
Provisório N° US 60/812.965, depositado em 13 de junho de
2006, cujo documento integral está ora incorporado ao
10 presente para todos os fins.

A presente invenção refere-se ao uso de sistemas
de distribuição para fornecer agentes antimicrobianos, e,
particularmente, agentes antimicrobianos do tipo
pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de
15 poliéter ou ambos, para composições fluidas em processos
industriais, particularmente,, a pastas ou soluções de
alimentação usadas na produção do álcool via fermentação em
uma forma pré-solubilizada, onde esses agentes
antimicrobianos estão disponíveis para o controle de
20 organismos indesejáveis tais como lactobacilos,
imediatamente ou em um curto período de tempo. Pelo menos
uma parte dos agentes antimicrobianos são adicionados com
vantagem numa forma dissolvida, por exemplo, dissolvida num
solvente orgânico ou em uma mistura de solventes preferindo-
25 se solventes apróticos. Este novo método de adição de
agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes
antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos, para
composições fluidas em processos industriais abrange novos

usos, inclusive: 1) novos regimes de dosagem para grandes tanques tais como fermentadores, onde esses agentes são tradicionalmente adicionados, 2) rápida (em seis horas) erradicação de lactobacilos viáveis, 3) erradicação de biomassas fixadas contendo microorganismos indesejados, e para tratamentos de pulso controlado de ares limitadas de uma instalação incluindo por exemplo, trocadores de calor. Adicionalmente, a adição de agentes biocidas prontamente disponíveis proporciona atividade desejada mesmo em vasos de reação fracamente agitados onde os agentes biocidas pulverizados tradicionais são substancialmente ineficazes.

A produção de etanol através da fermentação anaeróbica de uma fonte de carbono pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos melhores processos biotecnológicos conhecidos, sendo responsável par uma produção mundial de mais de 35 bilhões de litros por ano. Dois terços da produção está localizada no Brasil e nos Estados Unidos com o objetivo principal do uso do etanol como uma fonte renovável de combustível. Portanto, há fortes incentivos econômicos para melhorar ainda mais os processos de produção de etanol. O preço da fonte de açúcar ou fonte de carboidratos é um parâmetro de processo muito importante na determinação da economia global da produção do etanol. Usando leveduras inalteradas, os maiores rendimentos obteníveis é de apenas cerca de 51,1% como restante ficando perdido para a manutenção e crescimento da levedura, produção de glicerol e outros produtos finais.

O rendimento típico do etanol é menor do que o rendimento teórico máximo supra descrito, devido, em grande parte, a microrganismos competitivos.

Uma instalação de produção de etanol típica
5 compreende um vaso de pré-misturação onde a água e a fonte de combustível de carboidrato (a seguir referida como pasta) são mantidos a 40°C a 60°C e onde (caso o milho seja a fonte de carboidrato) é adicionada uma pequena quantidade de enzima tal como α -amilase. A pasta é a seguir aquecida entre
10 90°C - 150°C por um período de tempo, e a seguir resfriada e mantida entre 80° - 90°C à medida que a pasta se liquefaz. A pasta é em seguida resfriada para 60°C podendo ser adicionadas enzimas adicionais numa etapa de sacarificação. Após um período de tempo a 60°C a pasta é resfriada para
15 temperatura ambiente a ~35°C, e o líquido é então enviado a fermentadores, onde se adiciona a levedura para converter os açúcares em etanol. Num processo contínuo a utilização de uma série de fermentadores ligados em série é típica, porque isto é necessário para conversão eficiente dos açúcares e
20 também porque as condições favoráveis de produção de etanol (o que depende da quantidade de álcool e de outros subprodutos presentes na pasta) podem ser otimizadas. Finalmente, a fração álcool/água é enviada a uma coluna de destilação onde se extrai o álcool e o material residual
25 encontra um grande mercado na indústria de alimentação animal. Grandes volumes são processados e como se pode imaginar, com todas as alterações de temperatura envolvidas

no processo, os trocadores de calor são críticos para, tanto produção pura de energia como para a economia do processo.

Um problema particularmente difícil é o controle de microorganismos competitivos, em particular *Lactobacillus* spp, que compete com a levedura para nutrientes e produz ácido láctico. Outros microorganismos tais como *Acetobacter/Gluconobacter* e leveduras selvagens também devem ser controlados. Visto o controle dos lactobacilos ser crítico para a viabilidade do processo e, visto o controle de uma classe de microorganismos pelos métodos aqui descritos resultar em controle de pelo menos alguns dos outros microorganismos, este debate irá focar-se no controle dos lactobacilos. O perito na técnica saberá que uma série de outros microorganismos competitivos também serão controlados pelos processos de tratamento aqui descritos, dependendo dos antibióticos e antimicrobianos empregados no processo. A contaminação por lactobacilos na faixa de 10^6 a 10^7 por mL pode reduzir o rendimento do etanol em 1-3%. Os Lactobacilos estão presentes em todas as fontes de carboidratos adventícias, e estão presentes em todas as áreas da instalação de produção do etanol. Em processos industriais tais como na manufatura do etanol para combustível, mesmo com programas de controle ativo para o controle da proliferação de lactobacilos, as perdas de carboidratos para os lactobacilos podem variar até vários porcentos da produção total de carboidratos, o que pode fazer a diferença entre a lucratividade e a não-lucratividade. Além disso, caso o teor de ácido láctico da

pasta atinja 0,8% e/ou concentração de ácido acético exceda 0,05%, a levedura produtora de etanol fica estressada, reduzindo seu metabolismo. Na manufatura de algumas bebidas alcoólicas, a proliferação dos lactobacilos e seus
5 subprodutos podem alterar, desfavoravelmente, o sabor e o valor do produto.

Um programa de controle bastante eficaz envolve a introdução ao processo, de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e particularmente, virginiamicina. Esses
10 agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e particularmente, virginiamicina, são preferidos pelo fato de que: 1) eles são muito eficazes contra uma série de microrganismos, incluindo lactobacillos em baixa concentração, por exemplo, 0,3 a 5 ppm, 2) microrganismos
15 não tem a tendência em desenvolver resistência a este tipo de agente antimicrobiano, 3) o agente antimicrobiano não importuna, significativamente, a levedura, e 4) o agente antimicrobiano é eficazmente destruído pela secagem do produto final "de despejo", de modo que, ele não é
20 introduzido indiscriminadamente ao meio ambiente. Normalmente, o subproduto "de despejo" conhecido como "Dried Distillers Grains with Solubles (DDGS)", é comercializado como alimento animal, destinando 45% ao gado leiteiro, 35% gado de engorda, 15% a suínos e 5% para indústrias de aves.

25 Este é um importante fator na lucratividade de um processo de produção de etanol e a quantidade total deste subproduto produzido por ano é da ordem de 3,5 milhões de toneladas métricas por ano. A presença de agentes

antimicrobianos residuais neste material pode afetar adversamente o valor deste subproduto, porque pequenas quantidades residuais dos agentes antimicrobianos na alimentação irá promover o desenvolvimento de microrganismos resistentes ao agente. Foram analisadas amostras DDGS de 8 principais produtores de etanol usando virginiamicina para controlar microrganismos não se encontrando uma quantidade visível de virginiamicina nos DDGS (<1 ppm via análise Eurofins legitimado e < 1 ppb via um procedimento analítico experimental não legitimado). Incidentalmente, a alimentação animal é, o mais das vezes, suplementado com virginiamicina, o que demonstrou aumentar significativamente, a produção, quando usado numa série de alimentos animais. Em geral, entretanto, virginiamicina na pasta fica destruído pela secagem, de modo que virginiamicina pode ser novamente adicionado para a carga de alimentação caso se deseje. Outros agentes de controle eficazes incluem agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter que proporciona muitos benefícios obtidos com os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, . Outros agentes de controle na indústria incluem antibióticos à base de tetraciclina, estreptomicina, antibióticos a base de penicilina (por exemplo, G, V, ou N) e bacitracina. Estes não favorecem porque os microrganismos podem desenvolver rapidamente tolerâncias e a presença dos microrganismos que são resistentes a esses antibióticos podem criar problemas com a percepção do público e com alguma utilização do material de dejetos ou residual após fermentação, como alimento para

animais. Nos testes com virginiamicina, uma mistura de ~70-75% de penicilina / 10-15% de virginiamicina / 10-15% de estreptomicina e "KPenG" um produto comercial, descobriu-se que *L. plantarum* desenvolveu resistência a KPenG em cerca de 2 semanas, desenvolvendo resistência à mistura em cerca de uma semana, porém não demonstrou desenvolvimento de resistência a virginiamicina durante 10 semanas completas em que durou o teste. Além disso, a penicilina e estreptomicina ficam parcialmente inativadas ao pH dos fermentadores. Ainda, existem problemas com a segurança do operador, bem como alergias.

Demonstrou-se que, para antibióticos tais como penicilina, a adição pulsada de antibióticos é significativamente superior comparado à adição contínua da mesma quantidade de antibióticos. Ver, por exemplo, Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by Constant or pulsed addition of penicillin G, Appl. Microbiol Biotechnol (2003) 62-498-502 por Bayrock, Thomas e Ingledew. Acredita-se que isto prolongue-se para outros tipos de agentes antimicrobianos. Fez-se uma análise da dosagem pulsada versus dosagem contínua em *L paracasei* e descobriu-se que, a dosagem pulsada baixou a contagem de microrganismos para cerca de 30% do valor obtido com a dosagem contínua, onde a mesma quantidade de agentes antimicrobianos é adicionada em ambos os casos. Sabe-se em geral que maiores concentrações de agentes antimicrobianos resulta em maiores números de microrganismos com vista à destruição do que concentrações menores. A adição no modo

pulsado dos agentes antimicrobianos é tida como mais eficaz do que o tratamento contínuo, porque a maior concentração (mesmo se presente para apenas um período curto de tempo) reduz o número de microrganismos visados suficientemente, de modo que o rechaço de microrganismos visados sobreviventes durante períodos entre os tratamentos resulta em menores microrganismos viáveis totais (tirando a média X tempo) do que o que se ontem por tratamento contínuo com a mesma quantidade do agente antimicrobiano.

Os processos e materiais desta invenção são particularmente úteis para introduzir os agentes antimicrobianos com muito pouca solubilidade em água, por exemplo, uma solubilidade menor do que cerca de 10^{-2} e freqüentemente, menos que cerca de 10^{-3} g por litro em água. A solubilidade de monensina, virginiamicina e agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina similares, bem como agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter em água é muito baixa. Agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, especialmente virginiamicina, têm solubilidade extremamente baixa em água (por exemplo, 0,001 g/L) e adicionalmente, a cinética de dissolução é bastante baixa. de modo similar, ionóforos de poliéter têm solubilidade em água extremamente baixa.

O tratamento típico de instalações de etanol com agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ou ionóforos de poliéter é propiciado por adição intermitente de pós, sejam como material solto ou encerrado em sacos ou bolsas dissolvíveis contendo uma quantidade determinada do

agente antimicrobiano a um ou mais dos grandes tanques de
misturação. Duas formulações da técnica precedente
comerciais usadas em instalações de tratamento de etanol de
virginiamicina compreende pó de diâmetro médio de 5,2 a 10 μ
5 e cerca de 1000 μ , respectivamente. Descobriu-se que, um
fator de impedimento no controle de pestes tais como os
lactobacilos é a velocidade de dissolução de pequenos
agentes granulares de antimicrobianos do tipo
pristinamicina, e agentes antimicrobianos do tipo ionóforo
10 de poliéter em água ou na pasta. Uma amostra de 0,1 g de um
tamanho de partícula médio de 5.2 a 10 μ de virginiamicina
foi colocada num béquer com 4 litros de água, e a composição
foi contínua e vigorosamente agitada. Gastou cerca de 1 hora
antes de que, apenas uns poucos cristais do material
15 permanecesse visível. Essa dissolução lenta irá reduzir a
eficácia dos tratamentos pulsados porque leva muito tempo
para os agentes adicionados tornarem-se solubilizados e
eficazes, reduzindo a maior concentração dos agentes
adicionados resultantes de uma adição pulsada em processos
20 contínuos, porque algum agente pode ser removido do
fermentador ou de outro tanque antes da quantidade máxima do
agente adicionado ser solubilizado, e porque algum agente
adicionado pode não se dissolver de todo.

Nesses grandes tanques de misturação, há
25 freqüentemente tempo de residência e misturação suficientes
para alguma parte do virginiamicina dissolver-se. Contudo,
os tonéis de pasta e outros grandes tanques em instalações
de produção de etanol não são, tipicamente rigorosa e

completamente agitados, porque a energia necessária para uma tal misturação pode pesar demasiado na eficiência da levedura. Em um meio fracamente misturado, determinou-se que velocidades de dissolução podem levar muitas horas, e alguma

5 fração de produto de um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, e/ou agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter pode não ficar solubilizado de todo, e assim ativado. Mesmo a introdução de virginiamicina na forma pulverizada em tanques de misturação vigorosamente agitados

10 contendo a pasta alcoólica não resulta na dissolução completa do agente antimicrobiano, e o material sólido do agente antimicrobiano que não é dissolvido é perdido.

A invenção pode ser descrita genericamente como um método de controle do metabolismo de microrganismos

15 indesejados (por exemplo, lactobacilos em pasta numa instalação de produção de etanol, compreendendo a adição para a pasta de uma quantidade eficaz de um ou mais de um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, substancialmente insolúvel em água, um agente antimicrobiano

20 do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água, ou ambos, sendo que o termo "substancialmente insolúvel em água" significa que o agente antimicrobiano possui uma solubilidade em água pura a 20°C (temperatura ambiente) de cerca de 0,1 g/l ou menos, pelo que, pelo menos

25 uma parte dos agentes antimicrobianos substancialmente insolúveis em água são adicionados para a pasta na forma de uma solução orgânica compreendendo pelo menos um solvente orgânico com os referidos agentes antimicrobianos

substancialmente insolúveis em água ali dissolvidos, a solução orgânicos compreendendo, com vantagem, pelo menos 1 g/l, de preferência, pelo menos 2 g/l, por exemplo, pelo menos 10 ou 50 g por litro do(s) referido(s) agente(s) antimicrobiano(s).

Numa modalidade o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende, consiste essencialmente de ou consiste de um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel em água. Numa outra modalidade o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende ou consiste, essencialmente de um agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água. Numa modalidade preferida, o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende ou consiste, essencialmente de pelo menos um virginiamicina e senduramicina e de pelo menos uma parte do(s) agente(s) antimicrobiano(s) é adicionada para a pasta na forma de um líquido orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico com os referidos agentes antimicrobianos substancialmente insolúveis em água aí dissolvidos. Por "líquido orgânico" ou "solução orgânica" significa um líquido que, de preferência compreende pelo menos 50% em peso de um ou mais solventes orgânicos. Numa outra modalidade o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende ou consiste essencialmente, de monensina e de pelo menos uma parte de monensina é adicionado para a pasta na forma de um líquido orgânico

compreendendo pelo menos um solvente orgânico com o referido monensina aí dissolvido.

numa modalidade preferida o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água consiste essencialmente de, ou consiste de um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, e pelo menos uma parte do referido agente antimicrobiano do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel em água é adicionado para a pasta na forma de um líquido contendo solvente orgânico compreendendo mais do que 10 g/L, preferivelmente mais de 50 g/l, mais preferivelmente mais de 100 g/l, de preferência mais de 50 g/L, mais preferivelmente mais do que 100 g/L, ou do agente antimicrobiano do tipo pristinamicina solubilizado. Numa outra modalidade, o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, substancialmente insolúvel em água e pelo menos uma parte do agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, é adicionado para a pasta na forma de um líquido contendo solvente orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico aprótico dipolar, tal líquido orgânico compreendendo mais do que 10 g/L, preferivelmente pelo menos 50 g/L, mais preferivelmente mais de 100 g/L, do agente antimicrobiano do tipo pristinamicina pré-solubilizado. Numa outra modalidade, o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende, consiste essencialmente de, ou consiste de um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, substancialmente insolúvel em água que é adicionado para uma solução aquosa ou pasta na forma de um líquido orgânico,

sendo que o líquido orgânico de preferência, compreende pelo menos um solvente orgânico aprótico dipolar, esse líquido orgânico, compreendendo mais do que 10 g/L, preferivelmente pelo menos 50 g/L, mais preferivelmente mais de 100 g/L, do
5 referido agente antimicrobiano do tipo pristinamicina.

Numa outra modalidade preferida, o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água consiste essencialmente, de, ou consiste de um agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em
10 água e pelo menos uma parte desses agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um líquido contendo solvente orgânico compreendendo mais de 10 g/L, preferivelmente mais de 50 g/L, mais preferivelmente mais de 100 g/L do agente antimicrobiano solubilizado. Numa outra
15 modalidade o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água consiste essencialmente, de ou consiste de um agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água e de pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma
20 de um líquido contendo solvente orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico aprótico dipolar, esse líquido orgânico compreendendo mais de 10 g/L, preferivelmente pelo menos 50 g/L, mais preferivelmente mais de 100 g/L, do agente antimicrobiano pré-solubilizado. Numa outra
25 modalidade o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água consiste essencialmente, de, ou consiste de um agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água que é adicionado par uma

solução aquosa ou pasta na forma de um líquido orgânico, sendo que o líquido orgânico de preferência compreende pelo menos um solvente orgânico aprótico dipolar, esse líquido orgânico compreendendo mais do que 10 g/L, preferivelmente pelo menos 50 g/L, mais preferivelmente mais do que 100 g/L, do agente antimicrobiano.

Numa outra modalidade, o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água consiste essencialmente, de, ou consiste de um agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água e de pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um líquido compreendendo um ou mais de pelo menos m solvente orgânico aprótico dipolar, pelo menos um acetato de alquila, pelo menos um lactato de alquila, ou combinações destes, referido líquido orgânico compreendendo mais do que 1 g/L, preferivelmente mais de 2 g/L, mais preferivelmente mais de 10 g/L, por exemplo, pelo menos 50 g/L do agente antimicrobiano. Numa outra modalidade pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um líquido orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico aprótico dipolar, pelo menos um acetato de alquila, pelo menos um lactato de alquila ou combinações destes, o líquido orgânico compreendendo mais de 1 g/L, preferivelmente mais de 2 g/L, mais preferivelmente mais de 10 g/L, por exemplo, pelo menos 50 g/L do agente antimicrobiano. Em quaisquer das modalidades presentes, pelo menos um aparte do dito agente antimicrobiano pode ser adicionado para a pasta na forma de um líquido orgânico

compreendendo pelo menos um de acetato de alquila onde a fração alquila possui entre 1 e 4 átomos de carbono, lactato de alquila onde a fração alquila possui entre 1 e 4 átomos de carbono, N,N-dialquilcapramida, onde a fração alquila possui entre 1 e 4 átomos de carbono, um sulfóxido, um alquilsulfóxido e/ou um dialquilsulfóxido, onde a fração alquila possui entre 1 e 4 átomos de carbono, N-alquilpirrolidona onde a fração alquila possui entre 1 e 4 átomos de carbono, pirrolidona, alquil formamida e/ou dialquil formamida onde a fração alquila possui entre 1 e 4 átomos de carbono, acetona, isopropanol, um butanol, um pentanol, ou combinações destes. Numa outra modalidade, pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um líquido orgânico compreendendo pelo menos 70% em peso de etanol em água. Numa outra modalidade, pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um líquido orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico aprótico dipolar, pelo menos um acetato de alquila, pelo menos um lactato de alquila, ou combinações destes, esse líquido orgânico compreendendo, com vantagem, mais de 20 g/L, do referido agente antimicrobiano. Numa outra modalidade o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel em água e pelo menos uma parte do agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, é adicionado para a pasta na forma de um líquido orgânico compreendendo pelo menos um acetato de alquila ou lactato de alquila sendo

que, a fração alquila contém entre 1 e 4 átomos de carbono. Numa outra modalidade o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, substancialmente insolúvel em água, sendo que pelo menos uma parte do agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, é adicionado para a pasta na forma de um liquido orgânico compreendendo um éster C₁₋₄ alquila de baixo peso molecular de ácidos orgânicos, por exemplo, e particularmente, acetato de etila, lactato de etila ou ambos. Numa outra modalidade pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um liquido orgânico compreendendo uma pirrolidona, uma amida, ou um sulfóxido. Numa outra modalidade pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um liquido orgânico compreendendo pelo menos 200 g do agente antimicrobiano dissolvido por litro do solvente orgânico. Numa outra modalidade pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a pasta na forma de um liquido orgânico com um ponto de fulgor em frasco fechado maior do que (200°F) = 93,3°C.

Numa outra modalidade pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é do para a pasta como uma composição compreendendo partículas compreendendo o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água, estando a referida composição na forma de uma lama compreendendo partículas e quaisquer líquidos orgânicos ou líquidos compreendendo os agentes antimicrobianos que foram descritos nas diversas modalidades supra.

Numa outra modalidade a instalação de produção de etanol compreende um tanque com uma entrada e uma saída e um trocador de calor com uma entrada e uma saída estando conectado em fluxo livre com a saída do referido tanque de modo que a pasta flui do tanque para o trocador de calor, compreendendo o método adicionar para a pasta a um ponto entre a saída do tanque e a saída do trocador de calor, uma quantidade eficaz do referido agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água na forma de um líquido orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico com os agentes antimicrobianos substancialmente insolúveis em água aí dissolvidos, referido líquido orgânico compreendendo mais de 1 g/L, preferivelmente mais de 10g/L do(s) agente(s) antimicrobiano(s).

Numa outra modalidade na instalação de produção de etanol, compreende pelo menos um trocador de calor, tal método compreendendo adicionar pelo menos uma parte do agente antimicrobiano para a pasta passando-a pelo trocador de calor. Numa outra modalidade a instalação de produção de etanol compreende pelo menos um tanque de misturação e pelo menos um trocador de calor, compreendendo o método:

- a) adicionar para a pasta no referido tanque uma parte do(s) agente(s) antimicrobiano(s) substancialmente insolúvel(eis) em água, e
- b) adicionar para a pasta passando-a através do trocador de calor, uma parte do agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água na forma de um líquido orgânico composto de pelo menos um solvente orgânico, tendo

aí dissolvidos os agentes antimicrobianos substancialmente insolúveis em água, esse líquido orgânico compreendendo mais de 1g/L do(s) agente(s) antimicrobiano(s) .

5 Numa outra modalidade pelo menos uma parte do agente antimicrobiano é adicionado para a composição aquosa como uma pasta por uma bomba de medição, que bombeia uma composição líquida compreendendo o agente antimicrobiano para a referida pasta.

10 As formulações descritas supra são úteis para uma série de aplicações além do controle dos microrganismos indesejados em instalações de produção de etanol. Agentes antimicrobianos tais como virginiamicina são usados numa série de aplicações, incluindo o uso supracitado como um suplemento oferecido a animais para encorajar o crescimento.

15 As composições da invenção são ativas em tonéis de pasta e outros grandes tanques em instalações de produção do etanol, que não sejam rigorosa e completamente agitados, onde agentes pulverizados são substancialmente ineficazes. Composições líquidas desta invenção também podem ser

20 pulverizadas sobre as superfícies do equipamento de processo que são umedecidas apenas de modo intermitente por exemplo, pasta, a por exemplo, nas partes superiores e topos dos tanques e fermentadores, onde o líquido pode secar e deixar uma quantidade pequena, porém eficaz dos agentes

25 antimicrobianos que irão desencorajar a formação de biomassa indesejada resultante da umectação ocasional e o mais das vezes, accidental pela pasta ou outro líquido rico em nutriente. Num meio fracamente misturado, a dissolução de

pós adicionados pode levar muitas horas, e alguma fração de um produto do agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, granular e/ou agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter podem não ser jamais solubilizados e, por isso
5 ativados. As soluções e lamas de várias modalidades desta invenção (usando solventes apropriados), são igualmente aplicáveis para uso nos citados campos de emprego, proporcionando uma série de benefícios, incluindo redução de pó, fácil incorporado dos agentes antimicrobianos à
10 alimentação, e maior estabilidade e capacidade de dispersão em sistemas aquosos.

Os desenhos mostram os dados de uma série de experimentos conforme a seguir:

A Figura 1 mostra a contagem de Lactobacilos
15 versus tempo na pasta dos fermentadores bem misturados com virginiamicina pulverizado da marca Lactrol™ (Brasil), virginiamicina pulverizado da marca Lactrol™ (Bélgica) ou virginiamicina solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) de acordo com esta invenção e ainda a contagem de Lactobacilos
20 num fermentador de controle bem misturado.

As Figuras 2 e 3 mostram (para experimentos em duplicata) a contagem de Lactobacilos versus tempo na pasta de fermentadores fracamente misturados com virginiamicina pulverizado da marca Lactrol™ Brasil, virginiamicina
25 pulverizado da marca Lactrol™ (Bélgica) ou virginiamicina solubilizado em DMSO de acordo com esta invenção, e num fermentador de controle fracamente misturado.

As Figuras 4 e 5 mostram a viabilidade da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de DMSO e 0 a 1000 ppm de DMSO, respectivamente.

As Figuras 6 e 7 mostram a produção de glicerol da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de DMSO e de 0 a 1200 ppm de DMSO, respectivamente.

As Figuras 8 e 9 mostram a produção de etanol da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de DMSO e de 0 a 1200 ppm de DMSO, respectivamente.

As Figuras 10 e 11 mostram a viabilidade da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de DMSO e de 0 a 1200 ppm de DMSO, respectivamente.

As Figuras 12 e 13 mostram a produção de glicerol da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de NMP e de 0 a 1200 ppm de NMP, respectivamente.

As Figuras 14 e 15 mostram a produção de etanol da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de NMP e de 0 a 1200 ppm de NMP, respectivamente.

A Figura 16 mostra a viabilidade da Levedura n° 2 em pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de DMSO.

A Figura 17 mostra a produção de glicerol da Levedura n° 2 em pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de DMSO.

A Figura 18 mostra a produção de etanol da Levedura n° 2 em pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de DMSO.

A Figura 19 mostra a viabilidade da levedura n° 2 em pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de NMP.

A Figura 21 mostra a produção de etanol da Levedura n° 2 em pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de NMP.

Um aspecto desta invenção é fornecer um líquido de fase única compreendendo um ou mais agentes antimicrobianos dissolvidos, particularmente, agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos, para a pasta ou para um ingrediente que forma a pasta em uma instalação de produção de etanol, onde os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, pré-dissolvidos, agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter ou ambos são adicionados num modo contínuo, em um modo pulsado, ou em um modo híbrido alternativo. O líquido compreendendo os agentes antimicrobianos dissolvidos compreende, vantajosamente, uma fase única, porque assim, não existem problemas associados com estabilidade nas emulsões. o líquido contendo os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, dissolvidos, agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter ou ambos compreende pelo menos cerca de 1 g do agente antimicrobiano por litro, por exemplo, pelo menos 5 g dos agentes antimicrobianos por litro, mais preferivelmente pelo menos 10 g dos agentes antimicrobianos por litro, anda mais preferivelmente pelo menos 20 g ou pelo menos 50 g dos agentes antimicrobianos por litro, e mais preferivelmente pelo menos 100 g ou mais dos agentes antimicrobianos por litro.

Solventes preferidos e mistura de solvente são as que apresentam impactos adversos muito poucos ou

desprezíveis na levedura e nos subprodutos DDGS (em quantidades necessárias para solubilizar e fornecer a necessária dosagem do agente antimicrobiano) e que solubilize mais do que 50 g de virginiamicina (ou de outros agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos) por litro, preferivelmente mais de 100 g por litro, mais preferivelmente pelo menos 150 g de virginiamicina (ou de outros agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos) por litro. Em geral, tanto os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, como os agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter apresentam solubilidade em solventes orgânicos polares. Alguns solventes preferidos incluem solventes apróticos dipolares, por exemplo, pirrolidonas como N-metilpirrolidona (NMP) amidas tais como dimetilformamida e dimetilsulfóxidos, (DMSO) que podem dissolver 100 g ou mais de virginiamicina por litro. Por exemplo, descobriu-se que NMP pode dissolver cerca de 290 g de virginiamicina por litro durante um curto período de tempo, e uma formulação estável com o tempo poderia ser produzida contendo entre 250 e 270 g de virginiamicina por litro de NMP. Os dados da literatura sugerem que, 200 g de virginiamicina podem ser dissolvidos em dimetilsulfóxido ou em dimetilformamida. O líquido compreendendo os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, dissolvidos, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter ou ambos, podem compreender vantajosamente, mais do que um solvente, por

exemplo, compreendendo dois ou mais solventes onde de preferência, pelo menos um solvente é um solvente aprótico dipolar.

Solventes apróticos dipolares podem não ser de utilidade, por exemplo, em instalações que fabricam produtos contendo etanol para consumo humano. O grau de solventes técnico é sempre preferido caso o etanol esteja sendo usado para combustível, porque alta pureza não é freqüentemente necessária e os solventes irão ser metabolizados ou recuperados na formulação de etanol/gasolina. Para o etanol como uma bebida, vantajosamente o solvente é adicionado numa forma mais pura, e o solvente é um material naturalmente encontrado no produto de bebida, ou o solvente é mais preferivelmente consumido pela levedura ou de outro modo tratado de modo a não ingressar na bebida. Em instalações que produzem etanol para consumo humano, os solventes preferidos são aqueles que solubilizam mais de 1 g, e preferivelmente, mais de 20 g, do agente antimicrobiano por litro, e são consumidos pela levedura, estão naturalmente presentes na bebida têm baixa toxicidade, e/ou são eliminados da bebida por processamento posterior. Um solvente orgânico polar útil é etanol com água, onde uma concentração razoavelmente alta (~70 g/l) dos agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, (por exemplo, virginiamicina) e quantidades algo similares dos agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter podem ser dissolvidos caso o líquido esteja em pelo menos 75% em peso de etanol (com água ao equilíbrio). Um problema com as

composições líquidas pré-solubilizadas é a presença de misturas altamente inflamáveis - etanol possui um ponto de fulgor de cerca de $55^{\circ}\text{F} = 12,8^{\circ}\text{C}$. Um ou mais propanóis podem ser de utilidade, caso o etanol seja usado para combustível.

5 Outros solventes úteis incluem C_4 e álcoois superiores ou poliálcoois, por exemplo, butanóis, pentanóis e similar, que quando misturados com água podem não ser imediatamente miscíveis com a água. Novamente, esses solventes têm pontos de fulgor entre cerca de $(60^{\circ}\text{F} \text{ e } 90^{\circ}\text{F}) = 15,5^{\circ}\text{C} - 32,2$ e são
10 inflamáveis.

Solventes de alcano não são usados para muitos dos agentes antimicrobianos, por exemplo, virginiamicina, usado nesta invenção.

Alguns ésteres de alquila C_{1-5} , preferivelmente C_{1-4}
15 de baixo peso molecular (C_1 a C_4 , preferivelmente C_2 a C_3) ácidos orgânicos, particularmente acetatos de alquila, propionatos, butiratos, lactatos, e similares também são conhecidos por serem benignos em termos de exposição a levedura e humanos e os agentes antimicrobianos preferidos
20 desta invenção todos apresentam solubilidade significativa nesses solvente. Portanto, vantajosamente, a fração alquila nos acetatos de alquila, lactatos de alquila e similares, é vantajosamente C_1 a C_4 sendo preferivelmente etila. Solventes exemplares incluem lactato de etila, acetato de
25 etila, 2-hidroxiacetato de etila, e similar. A inclusão de grupos hidroxila para a fração alquila ou fração de ácido são de utilidade. Os denominados solventes "verdes" que têm pouco efeito em humanos em concentrações razoáveis, são

preferidos. Esses solventes têm, tipicamente concentrações LD50 (para ratos, coelhos, e outros animais de teste) de pelo menos 5g/kg. Muitos desses compostos são usados na indústria alimentícia. Nem todos os ésteres de C₁₋₄ alquila de ácido orgânico de baixo peso molecular são preferidos. Alguns solventes tais como lactato de n-butila são classificados como venenosos pela via intraperitonal e concentração tóxica ao ar para humanos é de cerca de 4 ppm. Um solvente preferido é lactato de etila, CH₃CH(OH)CO₂C₂H₅, que descobriu-se poder dissolver cerca de 92 g de virginiamicina por litro. Lactato de etila é um solvente "verde" usado em aromatizantes e perfumes, por exemplo, e o lactato de etila é derivado do processamento do milho - os únicos efeitos colaterais para lactato de etila são seus poderes de solubilização intermediários (90 g/L) e no fato de que é ainda um solvente inflamável com um ponto de fulgor de 117°F = 47,2°C. A adição de grandes frações não polares para os ésteres de alquila de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (C₂ a C₄) não é de utilidade - o lactato de hexil etila pouco faz para melhorar a biodegradabilidade, depressão do ponto de fulgor ou solubilidade (apenas 24 g de virginiamicina por litro) e este solvente é, portanto menos preferido do que lactato de etila. Por outro lado, misturando-se ésteres C₁₋₄ alquila de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (C₂ a C₄) com um ou mais solventes apróticos dipolares pode fornecer uma solubilidade surpreendentemente alta, enquanto minimiza o impacto do solvente na levedura, no produto e no subproduto. Acetato de

etila (etanoato de etila) usado para descafeinação do café e para aromatizantes, também é um solvente benigno muito útil apresentando boa solubilidade dos agentes antimicrobianos utilizados nesta invenção. Acetato de amila, enquanto
5 bastante benigno possui um efeito solubilizante útil para monensina, porém a solubilidade de virginiamicina neste solvente está na extremidade inferior do que se entende por comercialmente possível.

Sulfóxidos e sulfonas são solventes úteis para
10 solubilização dos agentes antimicrobianos. O termo "sulfóxido" conforme aqui empregado, é representado pela fórmula R_1SOR_2 , onde R_1 e R_2 podem ser, independentemente, um grupo alquila, alquila halogenado, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, cicloalquila, cicloalquenila,
15 heterocicloalquila, ou heterocicloalquenila, e de preferência, cada R_1 e R_2 compreende entre 1 e 4 átomos de carbono. O termo "sulfona" conforme aqui empregado, é representado pela fórmula $R_1SO_2R_2$, onde R_1 e R_2 podem ser, independentemente, um grupo alquila, alquila halogenado,
20 alquenila, alquinila, arila, heteroarila, cicloalquila, cicloalquenila, heterocicloalquila, ou heterocicloalquenila, e preferivelmente, cada R_1 e R_2 compreende entre 1 e 4 átomos de carbono. Por todo este relatório "alquila" é geralmente empregado para referir-se a, tanto grupos alquila
25 não substituídos e grupos alquila substituídos. Alguns compostos relacionados tais como acetato de benzila são úteis para solubilizar alguns agentes antimicrobianos desta invenção.

Vantajosamente, a inflamabilidade do solvente é de tal forma, que as composições desta invenção podem ser usadas em uma instalação produtora de etanol sem rotulação e manuseio especial. Existem regras rigorosas referindo-se à presença de solvente inflamáveis em aditivos e químicos armazenados em instalações de produção de etanol. Por exemplo, o uso de etanol a 90% em processos a montante é rigorosamente restrito, apesar o produto da instalação sendo por exemplo, etanol a 90%. Geralmente, o material com um ponto de fulgor de $200^{\circ}\text{F} = 93^{\circ}\text{C}$ ou acima deste é freqüentemente considerado como não combustível, embora regulamentos federais, estaduais, e locais referindo-se à instalações de produção de etanol possam ter diferentes definições de inflamável e solventes restritos. Um solvente preferido é 2-pirrolidona com um ponto de fulgor de $265^{\circ}\text{F} = 129,4^{\circ}\text{C}$. Um outro solvente preferido é dimetilsulfóxido com um ponto de fulgor de $203^{\circ}\text{F} = 95^{\circ}\text{C}$. NMP é um solvente preferido, em termos de solubilidade versus problemas de saúde e de segurança, porém ele tem um ponto de fulgor de $199^{\circ}\text{F} = 92,7^{\circ}\text{C}$. Um sistema solvente preferido é uma mistura de solventes compreendendo NMP e um ou mais dentre dimetilsulfóxido ou 2-pirrolidona, onde a formulação pode ainda compreender água e onde a composição possui um ponto de fulgor de cerca de $201^{\circ}\text{F} = 93,8^{\circ}\text{C}$ ou maior sendo considerada não combustível enquanto solubiliza 150 a 250 g de virginiamicina/L.

Numa modalidade alternativa, o líquido compreende entre 5 e 25% em peso de etanol, por exemplo, entre 15 e

24,9% em peso de etanol sendo o restante, água. Geralmente, tais soluções, têm uma solubilidade extremamente limitada dos desejados agentes antimicrobianos, por exemplo, menos do que 1 g/L. AS concentrações de etanol maiores do que 25% são mais e mais eficazes na solubilização de ou monensina e virginiamicina ou de ambos, e a maior solubilidade é obtida a 75% de etanol, porém tais soluções, requerem manuseio e permissão especial em instalações de produção de etanol. Conforme aqui empregado, quando se descreve monensina quer-se dizer, tanto Monensina tipo A apenas, monensina compreendendo uma maioria do tipo A e um ou mais tipos B, C e D, e "monensina de sódio". Conforme aqui empregado, quando se descreve virginiamicina quer-se dizer uma formulação contendo virginiamicina tipo A, virginiamicina tipo B ou mais preferivelmente, uma combinação dos dois tipos.

Vantajosamente, os solventes podem ter uma concentração suficientemente alta de agente antimicrobiano e não devem (nas concentrações antecipadas do solvente nos fermentadores) afetar adversamente a levedura. Tipicamente, o controle suficiente dos lactobacilos é obtido nos tanque, fermentadores e similar entre 0,2 ppm a 1 ppm, e, tipicamente entre 0,3 ppm e 0,4 ppm, de agente antimicrobiano, preferivelmente virginiamicina (embora, ocasionalmente, u pico de até 3 ou 4 ppm ou nessa ordem, pode ser necessário sob determinadas condições). O tratamento com ionóforos de poliéter normalmente necessita entre 0,3 ppm a 3 ppm, e, tipicamente entre 0,5 ppm e 2 ppm de ionóforo de poliéter. Além disso, instalações são

dimensionadas de modo que para a maioria das aplicações, uma "dose" de virginiamicina suficiente para tratar um grande tanque de mistura fica entre uma onça e uma libra do ingrediente ativo. Presumindo uma densidade do solvente aprótico dipolar de 1 g/cm^3 , um líquido com 200 g/L do agente antimicrobiano dissolvido por exemplo, virginiamicina, necessitará ser adicionado a uma razão de 1,5 para 2 ppm de líquido para a pasta fornecendo a desejada concentração em ppm de 0,3 a 0,4 ppm do agente antimicrobiano. Além disso, a dosagem normal de 1 onça para uma libra para dosagem de grandes tanques de mistura necessitaria entre cerca de 140 mL e 2500 mL do líquido, o que é um volume fácil de embarcar, armazenar e manusear. Para os solventes empregados para formular este produto de 200 g/L, caso todos os tratamentos da pasta sejam virginiamicina solubilizado (ou outros agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos) o solvente ou solventes usados para solubilizar os agentes antimicrobianos não devem afetar prejudicialmente a levedura ou o material de alimentação na forma de subproduto quando presente em quantidades de, por exemplo, até cerca de 5 ppm. Caso os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, solubilizados, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos sejam usados apenas para tratamentos de pulso marcados de equipamento selecionado, por exemplo, trocadores de calor, a quantidade do solvente na pasta será mais provavelmente bem abaixo de 1 ppm. Por outro lado, caso

o solvente possa solubilizar apenas 1 g do agente antimicrobiano, por exemplo, virginiamicina, por litro, então o operador precisará adicionar o líquido a uma razão de 300 a 400 ppm de líquido para a pasta par obter a

5 desejada concentração de 0,3 ppm a 0,4 ppm de antimicrobiano. Para serem úteis, esses solventes usados para formular o líquido tendo agente antimicrobiano dissolvido em 1 g por litro não deve afetar adversamente a levedura a concentrações de até cerca de 500 ppm. Além

10 disso, a dosagem normal de 1 onça para 1 libra para dosagens de grandes tanques de misturaçao necessitaria entre cerca de 29 litros e 460 litros de líquido, o que é um volume extremamente difícil de embarcar, armazenar e manusear. Finalmente, o custo dos solventes usados impacta a

15 exequibilidade, e grandes quantidades de solventes são caras. Geralmente um líquido tendo apenas 1 g de agente antimicrobiano dissolvido aí dissolvido por litro do liquido pode não ser economicamente viável para emprego na dosagem de grandes tanques. Um tal líquido ainda pode ser

20 economicamente e praticamente usado, contudo, para tratamento intermitente pulsado de pequenos volumes de pasta, por exemplo, o volume da pasta passando por um trocador de calor para uma duração predeterminada de uma dose para tratar o trocador de calor.

25 Para modalidades de virginiamicina solubilizado desta invenção, pode ser de utilidade ter-se uma parte de todo o antimicrobiano virginiamicina numa forma modificada, tal como acetilada, para aumentar as características de

solubilidade em água sem destruir efetivamente a utilidade do agente antimicrobiano. Tipicamente as revelações presentes centram-se em virginiamicina, pelo fato deste ser o agente antimicrobiano preferido. Deve ser considerado, 5 contudo, que essas revelações são também aplicáveis em geral a outros agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina e agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter.

Para instalações industriais produtoras de etanol para uso como combustível outros solventes orgânicos 10 preferidos são os que em concentrações adicionadas não são prejudiciais para as leveduras, e que são separados da pasta aquosa no processo de destilação de modo a seguir o etanol, onde esse solvente é do tipo capaz de ser misturado à gasolina sem efeitos adversos.

15 Vantajosamente, em algumas modalidades desta invenção, o meio compreendendo os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos não requer permissão e manuseio especial numa instalação de etanol.

20 Um outro aspecto desta invenção é fornecer um líquido de múltiplas fases compreendendo um ou mais agentes antimicrobianos dissolvidos, particularmente agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter,

25 ou ambos, para a pasta ou para um ingrediente que forma a pasta numa instalação de produção de etanol, onde os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina pré-dissolvidos, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de

poliéter, ou ambos são adicionados num modo contínuo, num modo pulsado, ou em algumas alternativas ou modo híbrido. Nesta modalidade o líquido contendo os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter dissolvidos, ou ambos podem ser fornecidos como um líquido bifásico, por exemplo, como uma fase de óleo (ou solvente) de uma emulsão óleo-em-água. Os solventes devem ser selecionados para dar miscibilidade limitada com água, pelo menos em quantidades as quais as emulsões são formadas. Tipicamente, nessa emulsão óleo-em-água, a maioria do solvente e a maioria dos agentes antimicrobianos ficarão na fase oleosa, embora os agentes antimicrobianos e o solvente terão, ambos, alguma solubilidade limitada na fase aquosa da emulsão. Vantajosamente, a fase aquosa da emulsão óleo-em-água compreende pelo menos 50% em peso de água. As características da emulsão podem ser melhor descritas por tratamento das fases de óleo e água em separado, como se a emulsão fosse interrompida e as duas fases continuassem a existir separadamente. Vantajosamente o solvente ou fração "de óleo" da emulsão óleo-em-água compreende pelo menos 1 g do agente antimicrobiano (ou agente antimicrobiano) por litro, por exemplo, pelo menos 5 g dos agentes antimicrobianos por litro, mais preferivelmente pelo menos 10 g dos agentes antimicrobianos por litro, mesmo mais preferivelmente pelo menos 20 g dos agentes antimicrobianos por litro. A quantidade dos agentes antimicrobianos na emulsão pode ser aproximada pela quantidade dos agentes

antimicrobianos na fase oleosa dos tempos da emulsão que a fração de volume da emulsão é fase de óleo. Vantajosamente caso a emulsão seja um concentrado, então pelo menos 10% e preferivelmente pelo menos 20% em volume da emulsão é fase oleosa. Geralmente, tanto os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, como agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter apresentam solubilidade substancial em solventes orgânicos polares. Tais solventes contudo, podem apresentar alta solubilidade em água. Solventes úteis para emulsões incluem Álcoois C4 e álcoois superiores ou poliálcoois, por exemplo, butanóis, pentanóis e similares. Solventes dipolares apróticos são úteis em quantidades limitadas, mesmo se eles sejam muito solúveis em água e podem concentrar principalmente na fase aquosa.

Emulsificantes, tipicamente, devem ser adicionados a essas composições. A vantagem de uma emulsão sobre um líquido orgânico de fase única tal como o descrito anteriormente, é que uma emulsão irá ser muito resistente ao fogo. por outro lado, vários fatores que afetam a exeqüibilidade comercial desses tratamentos de emulsão são iguais para os tratamentos líquidos de fase única = a quantidade de tratamento que deve ser adicionada e o custo do solvente torna-se bastante alto, à medida que a concentração do ingrediente ativo decresce, a levedura não deve ser afetada prejudicialmente pelo solvente ou solventes em concentrações daqueles solventes que serão encontrados nos fermentadores, e os solventes não devem nas concentrações adicionadas afetar a utilidade do produto. Em geral, as emulsões são preparadas imediatamente antes de

introduzir a emulsão para a pasta conferindo altas forças de cisalhamento para a composição compreendendo as fases orgânica e aquosa.

Descobriu-se que, as formulações da técnica precedente não proporcionam o perfil de concentração antecipado quando misturadas aos tanques, porque isto leva um longo período de tempo (mais do que 10 minutos) para essas partículas dissolverem-se na pasta aquosa e as condições hidrodinâmicas e tempo de residência das partículas no tanque de mistura são tais que, algum material antimicrobiano não se dissolverá, mas será de fato, desperdiçado.. Portanto, um tratamento pulsado de um tanque de mistura de fato não propicia uma concentração ativa do material, como é freqüentemente descrito na literatura, ou seja, atingindo um pico que decai a seguir, à medida que o pulso ou dose é diluído pela pasta não tratada que ingressa. Ao contrário, a concentração dos agentes antimicrobianos efetivos num tanque de mistura dosado usando tratamentos da técnica anterior, tende a elevar-se lentamente e os picos a um ponto em que uma quantidade significativa do material já deixou o tanque de mistura e a concentração de pico e a área sob uma curva concentração-tempo irão ambos ser muito mais baixos do que o julgado. Usando as composições desta invenção, a dose eficaz (ou seja a dose do agente antimicrobiano que é eficazmente usado para o controle de microrganismos visados) combina-se muito proximamente da dose teórica. Em segundo lugar, maiores concentrações eficazes (e, portanto eficácia aumentada) do biocida são

atingidas de uma dose pulsada da composição desta invenção do que a obtenível com a mesma massa de partículas de dissolução lenta. Terceiro, dimensionando-se um pulso em termos de concentração eficaz versus tempo e a duração de um pulso pode ser conseguida. Quarto, as composições desta invenção podem ser utilizadas para tratar por meio de pulso operações unitárias tais como trocadores de calor, e pequenos tanques de misturação (especialmente por exemplo, tanques de tratamento de sacarose) onde o tratamento com as formulações da técnica precedente não era prático ou possível porque muito do produto adicionado seria descarregado com a água das operações da unidade visada antes da dissolução. Finalmente, usando as formulações da técnica precedente, apenas a parte solubilizado dos agentes antimicrobianos eram eficazes. AS bactérias visadas têm um diâmetro eficaz de cerca de 1 μ . Caso o agente antimicrobiano precipite-se do líquido orgânico quando o líquido é adicionado para a pasta, o precipitado irá ser de um tamanho próximo daquele de uma bactéria, digamos, entre ~0,02 μ a ~2 μ , e uma medida de controle é obtenível do agente antimicrobiano sólido direto para contato do microrganismos e/ou interação, aumentando assim, a eficácia de uma mistura de biocida particulado solúvel e precipitado da presente invenção se comparado com a eficácia de uma mistura do biocida solúvel e particulado das formulações da técnica precedente.

Reconhece-se que, em alguns casos a adição dos agentes antimicrobianos solubilizados para a pasta ou um

excesso do liquido aquoso resultará substancialmente e instantaneamente, em partículas de sub-mícron a nanométricas em uma "lama" onde a formação das partículas e o tamanho resultante das partículas depende em grande medida das condições hidrodinâmicas no ponto em que os agentes antimicrobianos solubilizados são adicionados para a pasta. A precipitação de partículas de sub-mícrons do agente antimicrobiano, que deve ocorrer em alguns casos na misturação de um liquido orgânico contendo os agentes com água ou pasta é mais vantajosa do que tentar obter agentes antimicrobianos de sub-mícron pulverizados. A desvantagem mais significativa dos agentes antimicrobianos de sub-mícrons pulverizados é a possibilidade de pó, tanto de operações normais e de embarque e manuseio normal do produto. Partículas de sub-mícron podem atuar mais como fumaça ou pó no ar.

Pode ser útil caso condições de fluxo não sejam suficientemente turbulentas adicionar-se os agentes antimicrobianos solubilizados e/ou particulados para uma corrente lateral pequena sob alto cisalhamento, onde esta corrente lateral pode então ser novamente introduzida para a pasta. Esta misturação pode ser feita imediatamente antes da introdução do agente antimicrobiano para a pasta, e pode utilizar alto cisalhamento ou uma temperatura elevada ou quaisquer combinações dos acima conforme o caso, dependendo da composição do material contendo os agentes antimicrobianos.

Numa modalidade, a fase líquida da composição líquida ou lama compreende água e até 25%, por exemplo, entre 15% e 23%, de etanol. Este etanol irá pré-dissolver uma parte muito pequena dos agentes antimicrobianos das partículas conferindo à lama injetada um pequeno, porém quase instantâneo vigor. Concentrações de etanol maiores do que 25% são mais e mais eficazes na solubilização de, ou monensina e virginiamicina ou ambos e a alta solubilidade é obtida a 75% d etanol, mas tais soluções requerem permissão e manuseio especiais em instalações de produção de etanol.

Mencionou-se tratamento contínuo, tratamento pulsado, e tratamentos híbridos. Um tratamento pulsado, fornece uma única dose do agente antimicrobiano para um vaso receptor, normalmente um tanque de misturação, a intervalos regulares que são vantajosamente espaçados, de modo que a concentração do agente antimicrobiano atinge uma alta adição logo após a dose e a seguir decai quando o material degrada-se ou é transportado para fora do tanque, o que ocorrerá por exemplo, em instalações de produção contínua. Descobriu-se, de fato que, há um período significativo de tempo entre a adição de uma dose das formulações da técnica precedente e o tempo do pico pedido do agente antimicrobiano ativo (dissolvido). Descobriu-se ainda que, o pico real de agente antimicrobiano dissolvido não é apenas mais demorado do que o pico teórico, mas também está a um valor de concentração menor do que a concentração teórica (presumindo distribuição, misturação e dissolução instantâneos). Ou seja, adição de 2 ppm de agente antimicrobiano do tipo usado

na técnica precedente pode conferir um pico de por exemplo, 1,5 ppm (ou ainda menor), do agente antimicrobiano dissolvido na pasta, onde a causa principal são partículas antimicrobianas não dissolvidas e agente transportado do tanque de misturação antes da dissolução. Usando as formulações da presente invenção permite-se uma concentração ativa muito mais próxima das concentrações teóricas. Além disso, a quantidade do agente antimicrobiano num pulso pode ser introduzida com o tempo, deixando que o operador prolongue a concentração de pico por um período de tempo definido pelo operador a fim de maximizar a eficácia. Este é um método híbrido de introduzir um ou mais agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos para a pasta, o que não era possível com o uso das formulações da técnica precedente.

Um outro aspecto desta invenção consiste em fornecer tratamentos pulsados de, um ou de ambos dentre 1) o líquido supracitado compreendendo os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, pré-dissolvidos, ionóforos de poliéter pré-dissolvidos ou ambos, a locais a montantes de uma operação unitária visada particular, por exemplo, um trocador de calor ou um tanque de processo de sacarose numa instalação de produção de etanol, onde o pulso não é diluído passando através de um grande tanque de misturação ou similar antes de atingir o trocador de calor ou o tanque de operação com sacarose. Naturalmente, que essas operações unitárias também podem ser tratadas num modo contínuo,

usando as composições desta invenção, porém muitos benefícios desta invenção não serão realizados pelos tratamentos contínuos. Adicionando-se uma dose pulsada do agente antimicrobiano onde o pulso é adicionado numa
5 quantidade suficiente para obter-se a desejada concentração do agente antimicrobiano ativo no desejado período de tempo, pode-ser reduzir em muito, a incrustação do trocador de calor. É bastante conveniente ter-se a capacidade de "dosar" um pequeno volume da pasta passando através de trocadores de
10 calor num intervalo mais freqüente do que o necessário para tratar o volume do produto. Trocadores de calor fornecem um local bastante atraente para os microorganismos proliferarem-se, porque a temperatura é, por natureza dos trocadores de calor, moderada dos extremos encontrados nos
15 tanques, e além disso há um fluxo contínuo de nutrientes. Trocadores de calor tornam-se sujos pelo crescimento de microrganismos, especialmente lactobacilos e o crescimento forma um filme que reduz significativamente a eficiência dos trocadores de calor. O tratamento de volumes muito pequenos
20 de pasta (a pasta que passa através do trocador de calor durante o tempo do pulso) é necessário, de modo que a carga geral dos agentes antimicrobianos para o volume total da pasta seja minimizada.

O tratamento pulsado dos trocadores de calor com
25 os agentes antimicrobianos pré-dissolvidos desta invenção tipicamente irão adicionar uma quantidade desprezível de solvente para o volume de massa. Um controle mais rigoroso de lactobacilos e/ou outros microrganismos é desejado nos

trocadores de calor. Tais tratamentos podem substituir os tratamentos intermitentes ou contínuos feitos para os grandes tanques, porém de preferência, tratamentos intermitentes ou contínuos suplementares adicionados aos grandes tanques. Caso o tratamento desses trocadores de calor esteja em adição ao tratamento pulsado de tanques de mistura a montante dos trocadores de calor, então vantajosamente pelo menos algumas doses pulsadas do agente antimicrobiano direcionado apenas ao trocador de calor dever ser sincronizado para coincidir com os tempos de concentração máxima do agente antimicrobiano ativo na pasta que ingressa nos tubos que levam ao trocador de calor. Em geral, a quantidade absoluta de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina,, ionóforos de poliéter ou ambos adicionados em um tratamento pulsado de um trocador de calor é uma fração pequena da quantidade de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ionóforos de poliéter ou ambos adicionados aos grandes tanques de mistura. Um programa de tratamento pulsado de um trocador de calor pode resultar no tratamento de apenas 1-5 por cento da pasta, e estes 1-5% são tipicamente diluídos por um fator de 20 a 100, quando o pulso atinge o próximo grande vaso de mistura. Caso apenas 1 por cento da pasta seja tratado no tratamento de pulso de trocadores de calor, a uma composição de 4 --m de agente antimicrobiano, então a carga adicionada do agente antimicrobiano para o volume total da pasta (a média sobre a pasta tratada com pulso no trocador de calor e a pasta não tratada que passa através de um trocador de

calor entre as doses) seria de apenas 0,01 vezes 4 ppm ou 0,04 ppm. Caso este pulso de 4 ppm dos trocadores de calor for realizado usando agentes antimicrobianos solubilizados num solvente com 20% em peso do agente antimicrobiano, então o solvente adicionado para o volume total de pasta será de apenas 0,2 ppm. Contudo uma razão de dosagem de 4 ppm é apenas empregada para contaminação invasora grave. O tratamento de pulso dos trocadores de calor será feito normalmente, adicionando-se 0,4 ppm de, por exemplo, virginiamicina solubilizado (que suplementa a concentração de virginiamicina dos tratamentos prévios no tanque de misturarão), e sob o quadro descrito supra o tratamento pulsado regular dos trocadores de calor que solubilizaram virginiamicina adicionariam apenas 0,004 ppm de virginiamicina para a massa total de pasta, e adicionariam apenas 0,02 ppm do solvente para a massa total de pasta. O uso dos agentes antimicrobianos solubilizados para tratar operações unitárias específicas que têm um tempo de residência baixo, adicionariam uma quantidade desprezível de solvente à pasta.

Adicionalmente, a concentração dos agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter ou ambos no tratamento pulsado pode ser muito alta, acima de 3,1 ppm, por exemplo, 4 ppm ou mais, onde uma vez o pulso atinja um grande tanque de mistura o aumento na concentração de agente antimicrobiano no grande tanque de mistura é instantaneamente diluído a muito menos que 0,1 ppm.

Para qualquer sistema de produção, a otimização da concentração de pulso, duração e frequência fica dentro das capacidades do perito na técnica. Muitos benefícios desta invenção (distribuição mais rápida do ingrediente ativo) pode ser conseguida simplesmente, pela pré-umectação de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, pulverizados da técnica precedente ou ionóforos de poliéter num solvente de solubilização, particularmente etanol concentrado ou um solvente aprótico, tal que o solvente umedeça o pó e comece o processo de dissolução, mesmo se o pó esteja sendo adicionado ao processo, por exemplo, para os tanques de pasta. Alternativamente, os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ou ionóforos de poliéter podem ser solubilizados num solvente, e a seguir misturados com água formando uma emulsão ou uma composição aquosa com solvente, por exemplo, solventes polares apróticos, e agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ativos ou ionóforos de poliéter ativos e a emulsão ou composição aquosa pode ser misturada com o material para tratamento, por exemplo, pasta.

Um outro aspecto desta invenção é o fornecimento de uma fonte e unidade de bombeamento, de preferência, uma unidade auto-contida, que deve ser presa por meio de uma linha de alimentação a, por exemplo, na tubulação a montante, de, por exemplo, um trocador de calor ou a um vaso, e que fornece tratamentos pulsados, tratamentos contínuos, ou tratamentos híbridos, de um ou ambos dentre 1) agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, pré-

dissolvidos, ionóforos de poliéter pré-dissolvidos ou ambos ou 2) a lama supracitada compreendendo micropartículas ou partículas de sub-mícrons de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ionóforos de poliéter ou ambos, ou combinações destes, a uma razão suficiente para se obter uma concentração predeterminada na pasta escoando através da tubulação ou vaso receptor. A fonte e unidade de bombeamento podem ser fornecidas com sensores que monitorar o desempenho do trocador de calor, e que adicionam um pulso de agente antimicrobiano caso seja detectada a degradação da eficiência do trocador de calor. Em sua modalidade mais simples, esta fonte e unidade de bombeamento inclui uma bomba de medição (capaz de bombear uma quantidade conhecida de material para a pasta) e um pequeno reservatório para captar o agente antimicrobiano. Caso o agente antimicrobiano seja adicionado como uma lama e a lama apresentar sedimentação significativa, então um misturador deverá ser incluído no reservatório. A complexidade da fonte e unidade de bombeamento pode aumentar caso os operadores da instalação desejem maior automação. Tal automação é extremamente valiosa na economia de horas de trabalho do operador. A automação mais simples é adicionar um mecanismo de sincronização para a unidade de bombeamento, onde o mecanismo de sincronização pode controlar a duração de um pulso, da frequência de um pulso ou ambos. Para instalações de produção de etanol, onde as operações tendem a ser muito estáveis, isto é geralmente suficiente. Para tratamento de trocadores de calor, a temperatura simples e sensores de

velocidade de fluxo podem monitorar a eficiência do trocador de calor, e um simples programa pode ser feito para tratar o trocador caso a deterioração indesejada da eficiência do trocador de calor seja detectada. Um mecanismo à prova de falhas pode ser adicionado ao programa que domina os sensores e limita a frequência e duração dos pulsos, no caso de falha de um sensor ou que a incrustação do trocador de calor seja devida a um problema que não seja devida aos microrganismos.

Um benefício adicional em alguns solventes, especialmente solventes apróticos tais como DMSO, são conhecidos por serem ativos na penetração de membranas. Transportando agentes antimicrobianos dissolvidos, e, particularmente, agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter, ou ambos, esses solventes podem ajudar os agentes na penetração de acúmulos e filmes existentes de biomassa, e podem assim, ajudar a erradicar acúmulos fixos de biomassa indesejada que são, de outro modo, altamente resistentes aos agentes antimicrobianos.

Um outro aperfeiçoamento sobre a unidade de reservatório simples e bombeamento/distribuição consiste em incorporar um misturador para obter-se alto cisalhamento o que irá ajudar na distribuição dos agentes antimicrobianos ao meio aquoso. O misturador pode, de fato contatar a pasta e misturar a pasta e os agentes antimicrobianos pré-dissolvidos injetados no local onde os agentes antimicrobianos são adicionados porém neste caso devem ser

tomadas providencias especiais para consideração da variação de viscosidade, temperatura e teor de sólidos da pasta. Um dispositivo menos complicado, mas ainda eficaz será adicionar uma pequena fonte de líquido aquoso, por exemplo, 5 água, água/etanol ou similar, para a unidade de bombeamento/distribuição. Um misturador de alto cisalhamento pode ser incluído na unidade de bombeamento/distribuição. Neste condicionamento o agente antimicrobiano é adicionado para um volume do líquido aquoso sob alto cisalhamento e a 10 composição resultante é adicionada para a pasta imediatamente a seguir. A concentração do agente antimicrobiano dissolvido no líquido orgânico é benéficamente produzida tão elevada quanto necessário, de modo que os volumes de transporte e armazenagem sejam 15 minimizados. Esta fonte de líquido aquoso sob alto cisalhamento também é muito útil para adição dos agentes antimicrobianos pulverizados pastosos suplementais, na medida que um cisalhamento alto pode romper qualquer revestimento protetor adicionado para estabilizar as 20 partículas durante armazenagem, resultando em uma dissolução de partícula até mesmo mais rápida. Alto cisalhamento no local da mistura também irá evitar a precipitação do agente antimicrobiano no local da mistura,, o que é útil caso o ponto da injeção for um tubo muito pequeno, e irá 25 ajudar na formação de partículas extremamente pequenas (ou uniformidade das moléculas dispersas) do agente no líquido aquoso, garantindo esta condição, quando a composição resultante for adicionado para a massa. Ou seja, acredita-se

que a adição do líquido orgânico sob alto cisalhamento seja bastante útil para os agentes antimicrobianos dissolvidos, porque a adicionando o líquido orgânico contendo o agente antimicrobiano dissolvido até um excesso substancial de água (seja na misturadora ou na pasta) irá resultar na dissipação do solvente e resultante nanopartículas ou moleculares do agente antimicrobiano. A presença de uma fonte de líquido aquoso na unidade de bombeamento/distribuição também é útil porque o material nas linhas de distribuição e bocais de injeção (onde o agente antimicrobiano é de fato adicionado para a pasta) pode ser logo inundado com o líquido aquoso após cada tratamento. A quantidade de líquido aquoso adicionado para a pasta em cada tratamento seria desprezível, por exemplo, da ordem de uma taça e uns poucos galões sendo a quantidade útil. A água é o líquido aquoso preferido porque é prontamente disponível.

O uso desta invenção possui uma vantagem evidente de permitir o controle automatizado e fornecimento de agentes antimicrobianos, minimizando assim, o tempo e exposição do operador, e erros potenciais associados com o fato de ter que realizar o tratamento manualmente.

Um outro aspecto desta invenção é adicionar ao mesmo tempo agentes antimicrobianos dissolvidos e pastosos simultaneamente ou quase isso para a pasta. Este agente pré-dissolvido confere um efeito ao fluido injetado ou lama quase instantâneo. As partículas podem obter o volume dos agentes antimicrobianos durante a maior parte da duração de uma dose pulsadas. Uma ta mistura deve ser produzida

imediatamente antes da adição para a pasta, porque o solvente (caso esteja saturado com agentes antimicrobianos) irá eventualmente estender períodos de tempo, resultando no crescimento da partícula na lama.

5 Em cada uma das modalidades supracitadas, o agente antimicrobiano pode compreender, consistir essencialmente de ou consistir de um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, . O termo "agente antimicrobiano do tipo pristinamicina" abrange, sem limitação, à doricina, 10 patricina, vernamicina, etamicina, geminimicina, sinergistina, micamicina, ostreogricina, plauracina, estreptogramina, pristinamicina, piostacina, estreptogramina, vernamicina, virginiamicina, viridogriseina, maduramicina, plauracina e griseoviridina. Contudo, o agente 15 antimicrobiano preferido deste tipo é virginiamicina, disponível, por exemplo, de Phibro Animal Health Corp or Ridgefield Park, NJ. Em cada uma das modalidades supracitadas o agente antimicrobiano pode compreender, consistir essencialmente de, ou consistir de um agente 20 antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter, uma série dos quais é conhecida na técnica e inclui por exemplo, lasalocid, maduramicina, monensina, narasina, salinomycin e senduramicina, porém os agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter preferidos são monensina e 25 senduramicina. O agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, e os agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter podem ser usados em varias modalidades desta invenção sozinhos, juntos ou em combinação com outros

agentes antimicrobianos incluindo bactricina, penicilina, tetraciclina, oxitettraciclina e similares.

Embora esta invenção seja principalmente útil para agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, substancialmente insolúveis em água e agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter esta invenção também é útil para outros agentes antimicrobianos e para mistura. Uma série de misturas está a venda no mercado de antibióticos para o tratamento de microrganismos. A maioria das misturas inclui uma série de agente e inclui agentes para os quais, os microrganismos tornam-se logo resistentes. Combinações de agentes que não são agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e/ou agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter não são particularmente preferidos, porque mesmo se uma combinação compreender um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina, ou agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter, a quantidade deste agente é em geral presente em baixas quantidades, aumentando o risco de desenvolver um microrganismos resistentes. Não obstante, tais combinações podem se acomodar prontamente aos métodos e materiais desta invenção.

Os agentes antimicrobianos preferidos consistem de, ou consistem essencialmente de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e/ou agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter. A dose preferida de uso separado, é de pelo menos 0,25 ppm e, preferivelmente pelo menos 0,3 ppm dos agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ou 0,4 ppm e preferivelmente, 0,5 ppm dos agentes antimicrobianos

do tipo ionóforo de poliéter. Uma mistura dos agentes antimicrobianos eficaz do ponto de vista científico e econômico é uma mistura dos agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter. Pelo menos um destes deve ser adicionado para a pasta em sua dosagem eficaz preferida, porém com vantagem, ambos podem ser adicionados para a pasta nos menores extremos de suas composições eficazes preferidas. Esta mistura inclui apenas agentes antimicrobianos para os quais os microrganismos raramente desenvolvem resistência eficaz, e o uso de dois em combinação proporciona diferentes mecanismos de controle do microrganismo e eficiências diferentes em vários meios (pH, teor de açúcar, nutrientes, contaminantes variados e similar, presentes na pasta).

Agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter são mais rapidamente solubilizados pelos solventes orgânicos, e, portanto são mais prontamente usados quando se deseja agentes antimicrobianos solubilizados. Contudo virginiamicina é o agente antimicrobiano preferido e seu uso em tanques é altamente preferido. Caso os agentes antimicrobianos solubilizados sejam usados apenas para tratar operações limitadas, tais como trocadores de calor, a pasta resultante à jusante dos tanques de mistura no sistema de produção pode ter um traço porém não uma quantidade eficaz deste agente. Agentes antimicrobianos solubilizados adicionados para tratamento de operações unitárias pequenas tais como trocadores de calor, que adicionam uma quantidade muito pequena do agente

antimicrobiano quando visualizado sobre o volume total da pasta em subseqüentes tanques de mistura e fermentadores são benéficos do mesmo tipo de agente antimicrobiano que são usados para tratamento dos tanques.

5 A invenção pretende ser ilustrada pelos Exemplo aqui descritos, sem limitação pelos mesmos.

EXEMPLO 1

A solubilidade de monensina, virginiamicina e agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter em água é muito baixa. Muito importante, contudo, é a velocidade de dissolução de pequenos agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e agentes antimicrobianos do tipo ionóforo de poliéter em água. Uma amostra de 0,1 g de um tamanho médio de partícula de 5,2 a 10 μ de virginiamicina foi colocada num béquer com 4 litros de água, e a composição foi agitada continuamente. A presença de cristais não dissolvidos ficou bastante evidente. Levou cerca de uma hora antes de apenas uns poucos cristais do material permanecerem visíveis.

A solubilidade de virginiamicina em vários solventes foi determinada. Cada um desses solventes pode ser útil em material antimicrobiano compreendendo líquido orgânico solubilizado, uma emulsão do mesmo em água, ou em ambos. Os resultados se apresentam na Tabela 1 abaixo. Pode ser visto que, identificou-se, com surpresa uma série de solventes que proporcionam solubilidade em mais de 200 g de virginiamicina por litro de solvente, e mesmo uma formulação

que proporciona uma solubilidade superior a 300 g por litro. Uma tal solução é estável, bombeável e útil não somente para tratamentos de instalações de produção de etanol, mas para uma série de outros usos onde se utiliza virginiamicina.

5 Tabela 1 - Solubilidade de virginiamicina em g/l de solvente

	éster de soja metílico	< 1 g/L
	lactato de 2-etil hexila	~ 24 g/L
	lactato de etila	~92 g/L
	N,N-dimetilcapramida	~70 g/L
10	70% etanol/30% água	~70 g/L
	N-metilpirrolidona (NMP)	~260 g/L
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	~270 g/L
	50% NMP/ 50% DMSO	~335 g/L
	50% NMP/50% lactato de etila	< 200 g/L
15	álcool tetraidrofurfurílico	<160 g/L
	50% NMP / 50% lactato de etila	forma um gel duro a 280 g/L.

Também se espera que, geles, incluindo geles duros sejam úteis como o gel que irá dissipar-se rapidamente quando misturado à pasta, especialmente a elevadas temperaturas. Além disso, os dados d literatura foram obtidos para a solubilidade de compostos "tipo virginiamicina" numa série de solventes, incluindo dimetilformamida (200 g/L), DMSO (>100g/L), clorofórmio (não preferido) (150 g/L, dioxano (não preferido) (130 g/L), 25 etanol (70 g/L), metanol (25 g/L), acetato de butila (35 g/L), acetato de etila* (~205 g/L), acetato de amila (>4 g/L), benzeno (>3 g/L), tolueno* (82 g/L), éter* (11 g/L),

hexano (0,2 g/L), tetracloreto de carbono (0,02 g/L), etanol em água a 1% (0,002 g/L) e água (0,0002 g/L). Os solventes comercializados com um "*" tinham solubilidades muito desproporcionais para os componentes do tipo A e Tipo B de virginiamicina, e são menos adequados para misturas naturais preferidas de virginiamicina tendo ambos os tipos A e tipo B. Solventes apróticos tais como NMP, dimetilformamida, e DMSO mostram excelente capacidade de solubilização para os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ou ionóforos de poliéter. Pesquisas na literatura mostram que monensina é muito mais solúvel numa série de solventes do que virginiamicina, e monensina é menos solúvel em acetato de etila, acetona, clorofórmio, metanol, e até mesmo benzeno.

EXEMPLO 2

Os inconvenientes na adição de virginiamicina dissolvido em um solvente são 1) quais benefícios são vistos e 2) são estes efeitos prejudiciais? O testes foram realizados para se determinar se NMP em quantidades que devem ser encontradas na pasta de tratamento numa instalação de etanol com agente antimicrobiano solubilizado iria estressar ou afetar, de outro modo prejudicialmente a produção de etanol a partir de leveduras. Como antes descrito, sob uma série de quadros de tratamento, a quantidade de solvente usada irá expor a levedura a, talvez, 0,1 ppm de solvente, e suspeita-se que esta quantidade não irá ter efeito na levedura. Contudo esta suspeita teve de ser provada.

A finalidade deste experimento é determinar a eficácia de virginiamicina em três formas virginiamicina solubilizado com DMSO, virginiamicina pulverizada da Bélgica, e virginiamicina pulverizada do Brasil) em 5 fermentações de pasta de milho autênticas contra uma associação de bactérias *Lactobacillus* sp. Nenhuma levedura será adicionada. A eficácia dessas formas de virginiamicina será ainda analisada em fermentadores que irão ser adequadamente (continuamente) misturados e em fermentadores 10 tendo uma mistura inadequada - simulando a misturação mais próxima de condições de misturação no fermentador vista em instalações de etanol no campo.

A primeira etapa do teste foi a preparação da pasta de milho (ou seja, gelatinização, liquefação e 15 sacarificação). Sacas de milho amarelo n° 2 (adquirida de Early's Feed™, Saskatoon, SK, Canadá) foram congeladas a -40°C por uma semana a fim de destruir quaisquer insetos e ovos que pudessem estar presente. Uma alíquota de milho (10 kg) foi triturada uma vez em um Disk Mill S500 (Glen Mills, 20 Ind., Clifton HJ) no ajuste n° 5 e armazenada congelada até o dia seguinte. A menos que indicado em contrário, toda a água utilizada nos exemplos foi água tratada por osmose inversa. Cerca de 17,5 litros de água foi adicionado para uma chaleira a vapor da instalação piloto de 59 litros e 25 aquecidos a 60°C seguido por um volume de 30 ml de Spezyme™ alfa amilase etila (disponível de Genencor, Rochester, NY) A alíquota de 20 kg de milho moído foi então adicionado lentamente com vigorosa e constante misturação com uma pá

automática. Esta misturação foi mantida por todo o procedimento de formação da pasta. A temperatura na chaleira a vapor foi aumentada em incrementos de 60°C para 96°C em incrementos de 10°C com um tempo de manutenção de 5 minutos a cada incremento. Uma vez ser atingidos os 96°C, a mistura foi mantida por 60 minutos, (para garantir gelatinização completa) e a seguir resfriada para 83°C. Uma segunda dose de 30 mL de Spezyme™ alfa amilase etila foi adicionada mantendo-se a temperatura a 83°C por 60 minutos.

A temperatura da pasta foi a seguir diminuída para 60°C em cujo ponto 2L de água e 200 mL de G-Zyme™ 480 (glicoamilase de etanol) disponível de Genencor, Rochester NY) foram adicionados. A pasta foi deixada sacarificar por 60 minutos. Aliquotas de pasta (4500 g) foram fornecidas a 5 recipientes de polipropileno de 7,6 L pré-pesados (contendo grandes bolas de mistura de vidro sólidas) sendo submetidas a autoclave por 1,5 horas a 121°C e 15 psi. Os testes da esterilidade da pasta foram confirmados por incubação das alíquotas da pasta por 5 meses a temperatura ambiente e determinando-se a contaminação por bactérias com placas de disseminação microbiológica em meio MRS. Nenhuma contaminação bacteriana foi detectada em quaisquer pastas incubadas de teste.

Párea cada recipiente de pasta estéril de 7,6 L, uma alíquota de 60 g foi removida e dividida em duas sub-amostras de 30 g dentro de tubos centrífugos de 50 mL. Para uma sub-amostra, adicionou-se 10 mL de água RO. Após cuidadosa misturação, ambas as sub-amostras foram

centrifugadas (10 K rpm, 4°C, 20 minutos) em uma centrífuga Sorvaltm RC-5C (Sorvall Instruments Wilmington, Delaware). Os sobrenadantes líquidos foram removidos e ainda clarificados por meio de filtros de microfibra de vidro Whatman 934-AH (Clifton, NJ). A gravidade específica para cada sub-amostra foi a seguir determinada usando um medidor de densidade digital (DMA-45 Anton Paar KG, Graz, Áustria), que teve a temperatura regulada a 4°C. Caso as leituras no medidor de densidade estivessem fora da escala, então uma diluição exata das sub-amostra foi feita sendo novamente lidas no medidor de densidade. Da gravidade específica calculou-se o volume adicional de água DO estéril necessária em cada recipiente de 7,6 L para tornar a concentração de sólidos dissolvida a 26% p/v . Adicionou-se água estéril assepticamente para cada recipiente estéril de 7,6 L de pasta para se conseguir 26% p/v e sólidos dissolvidos sendo as amostras vigorosamente misturadas. A seguir alíquotas de 1500 g da pasta de cada recipiente de 7,6 L foi assepticamente distribuídas aos recipientes estéreis de 1,9 L, rotulados com o número do lote da pasta, data, e concentração de pasta, sendo congelados até o uso. Este volume preciso de líquido foi usado em todos os cálculos envolvendo concentrações de substâncias adicionadas ao fermentador, porque aproximadamente 30% do volume total no fermentador se trata de material insolúvel e não participa com um solvente para químicos de dissolução.

Para todos os experimentos bacterianos, foi usada uma associação de 6 culturas de *Lactobacilli spp*

industrialmente isolados e relevantes. Três dessas culturas (codificadas: 18^a, Rix20, Rix21) são representativas de Lactobacilos freqüentemente isolados de instalações de combustível etanol de North American. O restante (com os

5 códigos: Rix22, Rix83, Rix84) são Lactobacilos isolados do campo, porém não são freqüentemente encontrados em instalações de etanol combustível e apresentam características de desenvolvimento mais robustas e maiores tolerâncias ao estresse de fermentação. Este projeto

10 experimental usando uma associação de bactérias reflete melhor a contaminação bacteriana mundial real que ocorre na instalação de etanol combustível - o que não é nunca uma cultura pura. Além disso, usando os Lactobacilos "mais robustos" forneceu ao experimento com o "pior caso" de

15 quadro de contaminação.

Para quatro culturas bacterianas (18A, Rix20, Rix21, Rix22) um total de cada um foi retirado de um lote mestre e inoculados em um frasco de 250 mL Klett contendo 100 mL de caldo MRS. Para duas das culturas bacterianas

20 (Rix83, Rix84), três inclinações mestre em triplicata foram "lavadas" com, ou caldo MRS (Rix83) ou caldo YEPD (Rix84) e completados até um volume de 50 mL nos respectivos frascos Klett e meio. O espaço superior de todos os frascos foi então inundado com CO₂ estéril por 1 minuto. AS culturas

25 foram incubadas durante a noite numa incubadora rotativa a 30°C e 150 rpm. Na manhã seguinte determinou-se a leitura Klett de cada cultura. Caso um valor Klett para uma dada cultura estivesse abaixo de 150, então a cultura era

peletizada por centrifugação, um volume do líquido sobrenadante removido e a cultura em pelota ressuspensa no volume restante para dar uma cultura mais concentrada. Uma vez que todas as culturas demonstrassem um valor Klett >150, então cada cultura era diluída precisamente até 150 Klett, e a seguir diluída de modo que uma alíquota de 10 ml de cada cultura continha uma dose inicial desejada (CFU/mL). em cada fermentador foi ajustado em 5×10^5 CFU/mL. Nesta série de experimentos, nenhuma levedura foi adicionada para as fermentações. Ver o exemplo a seguir par atividade de levedura.

Para cada 5 fermentadores pré-esterilizados Bioflo III (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) 4 L de pasta estéril foi adicionada assepticamente e o líquido total em cada fermentador foi calculado. Os fermentadores tiveram a temperatura controlada em 32°C usando os computadores do fermentador. A agitação (quando ligada) foi ajustada em 150 rpm. O pH dos fermentadores não foi controlado e tinha um valor inicial de 4,6 (após adição de cada químico) . Quando se atingiu 32°C nos fermentadores, o espaço superior de cada fermentador foi purgado com CO₂ estéril a 40 mL/minutos por 30 minutos para garantir que, todo o fermentador (espaço superior e líquido) estivesse anaeróbico para inoculação. A purga continuou também durante a fermentação para manter as condições anaeróbicas. Os inóculos bacterianos foram então adicionados e deixados ajustar por 1 horas para as condições no fermentador. Em seguida, a adição de virginiamicina (em qualquer forma) foi adicionado para o fermentador apropriado

para dar início ao experimento. Para adições de LactrolTM (um produto contendo virginiamicina disponível de Phyllochem Inc. Ridgefield, NJ) as quantidades apropriadas foram pesadas até décimos em frascos de cromatografia com tampa de rosca de vidro de 3 mL. Por ocasião da adição aos fermentadores 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 2 mL "lavagens" foram feitas em cada frasco para o fermentador para garantir transferência quantitativa de todo o material pesado. Para adições de todas as formas de virginiamicina, as quantidades para adição a cada respectivo fermentador foram calculadas para conferir um nível de virginiamicina de 1 ppm por todos os fermentadores. Para se conseguir isto, a quantidade de LactrolTM (dois LactrolsTM foram testados - uma origem belga e uma origem brasileira) necessária para adição ao fermentador apropriado foi de 4,549 mg enquanto para os fermentadores tratador com virginiamicina solubilizado com DMSO, a quantidade de virginiamicina solubilizado com DMSO (contendo 270 g de virginiamicina) necessária para adição foi de 8,4 µL. Para cada fermentador, adicionou-se também 10 mL de solução de estoque de uréia esterilizada a filtro de 0,2 µm (obtendo 8 mM de uréia nos fermentadores), 60 mL (6 culturas x 10 mL por cultura) de inóculos bacterianos e 40 mL de água estéril.

Para cada conjunto de testes em condição de fermentação os testes foram realizados em duplicata. Duas condições experimentais foram testadas, simulando um tanque bem misturado e um tanque fracamente misturado. Para os

fermentadores na condição bem misturada, a misturação do fermentador foi mantida constante a 150 rpm. Para os fermentadores na condição fracamente misturada, a misturação no fermentador foi misturada por 10 segundos a 150 rpm para misturar o conteúdo do fermentador, sendo retiradas as amostras apropriadas, e a seguir a misturação foi parada por 12 horas. Esta condição de fraca misturação foi julgada simular as condições reais (ou até mesmo melhores do que as condições reais) porque os fermentadores experimentais apenas continham 4 litros de pasta cada um). Os fermentadores de misturação inadequada simulam as condições encontradas em instalações de etanol no campo onde não é incomum para os fermentadores serem misturados de modo inadequado (tempos de residência variando de 1 hora a 12 horas, dependendo do fluxo e tamanho do fermentador), ou terem sedimentos/biofilmes onde os químicos antimicrobianos não podem chegar facilmente.

Amostras de 33 mL dos fermentadores foram coletadas e colocadas em gelo para evitar o crescimento. Uma alíquota de 11 mL para cada amostra foi diluída em série em água peptona estéril a 0,1% p/v e microbiologicamente colocadas em placa de agar-ágar MRS em duplicata. Todas as placas foram incubadas por 48 horas a 30°C em uma câmara de incubação de CO₂ anaeróbica, e enumerados manualmente para Lactobacilos viáveis. As alíquotas de 22 mL restantes de cada amostra foram centrifugadas (10 K, rpm, 4°C, 20 minutos) numa centrífuga Sorvall RC-5C. O sobrenadante líquido foi então passado através de um filtro de membrana de 0,2 µm a

fim de remover quaisquer particulados e congelados. A seguir concentrações de ácido láctico, glicerol, etanol, ácido acético, e glicose foram determinadas por análise HPLC. AS amostras foram descongeladas e diluídas até o ponto necessário com água Milli-Q. Aliquotas de amostras diluídas (100 µl) foram cada uma misturadas com um volume igual de 2% de ácido bórico p/v (padrão interno) e injetadas em uma coluna Aminex HPX-87H da Biorad equilibrada a 40°C. O eluente constou de ácido sulfúrico 5mM fluindo a uma velocidade de 0,7 mL/minutos. Os componentes foram detectados por um refratômetro diferencial (modelo 4210, Waters Chromatographic Division, Milford, MA) e os dados subseqüentes processados pelo fornecedor de software Waters Millenium.

A figura 1 mostra a contagem de Lactobacilos versus tempo na pasta dos fermentadores bem misturados com virginiamicina da marca Lactrol™ (Brasil) Lactrol™ (Bélgica), virginiamicina solubilizar em DMSO de acordo com esta invenção, e também a contagem de Lactobacilos num fermentador de controle bem misturado. Como se esperava, a adição de 1 ppm de virginiamicina aos fermentadores que foram bem misturados preveniu o crescimento da associação de Lactobacilos (CFU/ml não excedeu 1E6). Esta falta de diferenciação era de se esperar, porque os benefícios da pré-solubilização do agente antimicrobiano era esperada ser mínima em fermentadores de 4 L pequenos a 150 rpm com pás misturadoras. Uma rápida misturação como essa tenderia a solubilizar virginiamicina pulverizada em uma hora ou algo

assim. A virginiamicina pré-sobubilizada com DMSO em fermentadores bem misturados mostrou eficácia igual (e nas 4 horas iniciais talvez ligeiramente melhor do que) aquela dos produtos virginiamicina pulverizada marca Lactrol™. Em
5 contraste, a associação de Lactobacilos na condição de controle aumentou em 4000 vezes do tempo de inoculação (AE5 CFU/ml) a 48 horas (2E9 CFU/ml). O teor de ácido láctico da pasta no controle aumentou com o tempo, atingindo 0,8% p/v. Não se observou, substancialmente nenhuma produção de ácido
10 láctico em quaisquer pastas tratadas com virginiamicina em qualquer ocasião. Análises de glicose foram inconclusas, porque os dados difusos obscureceram qualquer pequena alteração que se pudesse esperar.

Embora nenhuma diferença fosse vista no grau de
15 controle de produção de ácido láctico, nos fermentadores bem misturados, diferenças de fato existiram pelo tempo tomado para virginiamicina em cada caso a fim de eliminar todos os Lactobacilos detectáveis viáveis dos fermentadores. Por exemplo, para virginiamicina marca Lactrol™ do Brasil,
20 nenhum Lactobacilo viável detectável foi encontrado nos fermentadores após 24 horas. Para virginiamicina marca Lactrol™ da Bélgica nenhum Lactobacilo viável detectável foi encontrado após 12 horas. Contudo para virginiamicina pré-solubilizada com DMSO nenhuma Lactobacilo viável detectável
25 foi encontrado após apenas 6 horas. Virginiamicina solubilizado com DMSO proporcionou o mesmo grau de controle das outras formas de virginiamicina usadas, porém foi muito mais rápido na destruição das bactérias controladas do que

as outras formas de virginiamicina. Isto significa que, embora tratamentos com virginiamicina pulverizada da marca Lactrol™ mediante adição fossem eventualmente eficazes na interrupção do crescimento da associação de lactobacilos (mantendo uma condição bacteriostática) em fermentadores bem misturados, virginiamicina solubilizado com DMSO foi mais eficaz na destruição da combinação de lactobacilos, em que o tempo necessário para reduzir os lactobacilos viáveis era de 6 horas, comparado às 12 a 24 horas para virginiamicina pulverizada.

As figuras 2 e 3 mostram (para experimentos em duplicata) a contagem de Lactobacilos versus tempo em pasta dos fermentadores fracamente misturados com virginiamicina da marca Lactrol™ Brasil, virginiamicina da marca Lactrol™ (Bélgica), virginiamicina solubilizado em DMSO de acordo com esta invenção, e um fermentador de controle fracamente misturado. Virginiamicina pré-solubilizada com DMSO apresentou claramente controle superior dos Lactobacilos nos fermentadores fracamente misturados do que o fizeram quaisquer produtos de virginiamicina pulverizada. Isto é fato, apesar dos produtos pulverizados serem expostos a uma vigorosa misturação de 10 segundos, imediatamente após introdução dos pós para dispersão suficiente dos pós. A pasta tratada com virginiamicina pré-solubilizada com DMSO era substancialmente bacteriostática, enquanto as pastas tratadas com produtos pulverizados apresentaram aumento contínuo das contagens de lactobacilos. Acredita-se que os agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina,

solubilizados e ionóforos de poliéter e particularmente, virginiamicina pré-solubilizada com DMSO podem ter um poder de penetração e, portanto um efeito medicinal nos biofilmes. Sabe-se por exemplo, que o solvente DMSO hidrocópico
5 dipolar possui alta capacidade de penetração através de varias membranas.

Nos fermentadores fracamente misturados, a concentração de ácido láctico em pastas de controle não tratadas aumento quase linearmente, com o tempo atingindo
10 0,50 e 0,58% em peso em 48 horas em experimentos em duplicata. Nos fermentadores fracamente misturados, tratados com produto virginiamicina pulverizado da Bélgica, o ácido láctico atingiu 0,29 e 0,48% em peso /volume em 48 horas em experimentos em duplicata. Um controle muito melhor foi
15 apresentado pelo produto virginiamicina pulverizado do Brasil, porque a pasta nos fermentadores fracamente misturados atingiu apenas 0,02 a,19% em peso em 48 horas nos experimentos em duplicada. Porém o melhor controle foi observado nas pastas em reatores fracamente misturados
20 tratados com virginiamicina pré-solubilizada com DMSO porque nenhum ácido láctico detectável foi visto em 48 horas..

como nos fermentadores misturados adequadamente, virginiamicina pré-solubilizada com DMSO forneceu um grau consistente de controle da associação (sem multiplicação) e
25 ainda demonstrou completa destruição da combinação de lactobacilos. A única diferença entre os fermentadores misturados adequadamente e inadequadamente, foi a total destruição das bactérias que levou apenas 6 horas para os

fermentadores misturados adequadamente, enquanto gastou-se 24 horas para se conseguir os mesmos efeitos nos fermentadores misturados inadequadamente. Virginiamicina pré-solubilizada com DMSO foi o único produto que controlou e aniquilou as bactérias associadas nos fermentadores, onde a misturação não foi cuidadosa.

Houve diferenças na eficácia dos produtos Lactrol™ pulverizados. Não se tem certeza da significância prática que isto teve nos dois produtos para uma instalação de combustível etanol, visto que, pelo tempo que a fermentação atingiu 12 horas, as leveduras ajustaram-se ao fermentador e as leveduras começaram a inibir os lactobacilos. O fato de que o agente antimicrobiano pré-solubilizado, por exemplo, virginiamicina, tanto controla e aniquila pelo menos 90% de lactobacilos dentro de 6 horas propicia uma vantagem muito prática e eficácia em instalações de etanol enquanto as leveduras estão ainda tipicamente, ajustando-se ao meio no fermentador.

EXEMPLO 3

Dialquilsulfóxidos e alquil pirrolidonas, onde os grupos alquila são independentemente C1 a C4, são particularmente preferidos. A compatibilidade de dimetilsulfóxido (DMSO) e N-metil-2-pirrolidona (M-Pyrol ou NMP) com fermentações de pasta de milho levedadas foram avaliadas com duas leveduras (Levedura 1 e Levedura 2) comercialmente usada na indústria de combustível etanol. Composições de 0 a 1200 ppm de qualquer solvente foram adicionadas no começo das fermentações de pasta de milho

trituras a seco juntamente com qualquer levedura. Durante todo o tempo de fermentação, o crescimento (viabilidade) das leveduras sem qualquer concentração de qualquer solvente não foi diferente dos controles correspondentes (sem solvente).

5 O estresse da levedura não aumentou e qualquer concentração de solvente usado durante a fermentação - como se evidenciou pela falta de aumento de glicérol (um indicador de estresse para a levedura) se comparado com os controles. Além disso, o consumo de glicose prosseguiu normalmente para ambas as

10 leveduras sob todas as condições. A produção de etanol para todas as condições demonstrou as quantidades esperadas com exceção no caso de M-Pyrol com a Levedura n° 2. Neste caso a concentração de etanol a concentrações de M-Pyrol >400 ppm demonstrou claramente uma tendência forte no sentido de

15 concentrações menores de etanol à medida que a concentração de M-Pyrol aumentava. Contudo, ambos os solventes (ou uma mistura dos dois) são compatíveis com leveduras caso usados na distribuição de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e/ou ionóforos de poliéter numa forma pré-

20 solubilizada durante fermentação da pasta de milho. A solubilidade de agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, e/ou ionóforos de poliéter em DMSO e em NMP é de cerca de 250 g/L, de modo que, para se dosar uma pasta ou líquido com 1 ppm de agentes antimicrobianos do tipo

25 pristinamicina, e/ou ionóforos de poliéter em um fermentador ICM de galão de 750.000 galões, necessitaria de 2 galões de DMSO (contendo 1564,5 g de virginamicina solubilizado) para o fermentador. Isto tornaria o teor de DMSO no fermentador

em menos do que 2 gal / 750.000 galões de pasta ou menos do que 3 ppm do solvente total. Portanto, os efeitos prejudiciais na produção de etanol em 400 ppm de solvente ou maior não são pertinentes ao uso de M-Pyrol na distribuição por exemplo, de virginiamicina a uma pasta de milho.

Preparou-se pasta de milho estéril sacarificada a 26% em peso/ volume usando substancialmente o mesmo procedimento descrito no Exemplo 2. Para cada 6 fermentadores pré-esterilizados Celstir™ (Wheaton Instruments, Milville, NJ), 500 g de pasta estéril foi adicionada assepticamente. Os fermentadores tiveram a temperatura controlada em 32°C usando banhos de água circulante (Haake D8, G, Berlim, Alemanha) para bombear água através das camisas dos fermentadores Celstir. Agitadores magnéticos (IKA - Lavortechnik, Staufen, Alemanha) foram usados para misturar os fermentadores em aproximadamente 200 rpm. O pH dos fermentadores não foram controlados e tinham um valor inicial de 4,6 (após adição de todos os químicos. A seguir para cada fermentador adicionou-se 1) 1 ml de solução de estoque de uréia esterilizada a filtro de 0,2 µm (8 mM de uréia no fermentador) ; 2) 1 mL de DMSO aquoso esterilizado a filtro de 1 µm (Gaylord Chemical, CAS n° 67-68-5) ou soluções aquosas M-Pyrol aquoso (ISP, CÃS n° 872-50) e 3) 1,027 g de Levedura 1 ou Levedura 2 em leveduras secas comerciais ativas sem 18 mL de água estéril.

O teste e análise também foram similares aos descritos no exemplo 2. Amostras (22 mL) foram retiradas, a 0, 6, 12, 24, 36 e 48 hora e colocadas em gelo para evitar o

crescimento. Uma alíquota de 11 mL de cada amostra foi serialmente diluída em água de peptona estéril a 0,1% p/v e colocadas microbiologicamente em placas de agar-ágar MRS em duplicata. Todas as placas foram incubadas por 48 horas a 30°C em uma câmara de incubação de CO₂ anaeróbica, e enumeradas manualmente para *Lactobacilos* viáveis. A alíquota de 11 mL restante de cada amostra foi centrifugada (10 K rpm, 4°C, 20 minutos) em uma centrífuga Sorvall RC-5C. O sobrenadante líquido foi então passado através de um filtro de membrana de 0,2 µm para se remover quaisquer particulados e congelado para análise futura. Concentrações de Ácido láctico, glicerol, etanol, ácido acético e glicose foram determinadas por análise de hPLC. As amostras foram descongeladas e diluídas até o ponto necessário com água Milli-Q. Alíquotas das amostras diluídas (100 µl) foram cada qual misturadas com um igual volume de 2% p/v de ácido bórico (padrão interno) e injetadas em uma coluna Biorad HPX-87H Aminex™ equilibrada a 40°C. O eluente era ácido sulfúrico a 5mM fluindo a uma velocidade de 0,7 mL/minutos. Os componentes foram detectados por um refratômetro diferencial (Modelo 4210, Waters Chromatographic Division, Milford, MA) e os dados subseqüentes processados pelo software fornecido Waters Millenium32. Todas as fermentações foram realizada em duplicata.

Os testes descritos no Exemplo 3 foram realizados a concentrações extremamente altas dos solventes DMSO e NMP para exagerar quaisquer efeitos que os solventes pudessem ter feito na levedura. Como antes, tratamentos típicos de

agentes antimicrobianos e particularmente, agentes antimicrobianos do tipo pristinamicina, ou ionóforos de poliéter. Figuras 4 e 5 mostram a viabilidade da levedura n° 1 em pasta de milho contendo 0 a 200 ppm de DMSO de 0 a 1000 ppm de DMSO, respectivamente. As figuras 6 e 7 mostram a produção de glicerol da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo 0 a 200 ppm de DMSO e 0 a 1200 ppm de DMSO, respectivamente. Pode-se ver dos dados que, mesmo 1000 ppm de DMSO não parece afetar a viabilidade da Levedura n° 1) ou estressar a Levedura n° 1 mesmo após 48 horas de exposição. Durante uso normal com a presente invenção, o solvente total adicionado (que pode ser DMSO e/ou outros solvente) para a pasta para transportar agente de controle biológicos pré-solubilizados espera-se ser menos que 10 ppm. As figura 8 e 9 mostram a produção de etanol da Levedura n° 1 em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de DMSO e de 0 a 100 ppm de DMSO, respectivamente. Como antes, o DMSO não impediu a produção de etanol.

As figuras 10 e 11 mostram a viabilidade da Levedura n° 1 em pasta e milho contendo 0 a 200 ppm NMP (M-pyrol) e a 1200 ppm de NMP, respectivamente. Figuras 12 e 13 mostram a produção de glicerol da Levedura n° em pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de NMP e de 0 a 1200 ppm de NMP, respectivamente. Há um ligeiro declínio na viabilidade da levedura a concentrações de NMP acima de 400 ppm. As figuras 14 e 15 mostram a produção de etanol da Levedura n° 1 na pasta de milho contendo de 0 a 200 ppm de NMP e de 0 a 1200 ppm de NMP, respectivamente. Novamente, houve um

ligeiro declínio na produção de etanol da levedura n° 1 com incrementos de NMP de 8,1% no controle a 7,8% a 1000 ppm de NMP.

A figura 16 mostra a viabilidade da levedura n° 2 em pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de DMSO. A figura 17 mostra a produção de glicerol da levedura n° 2 na pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de DMSO. A figura 18 mostra a produção de etanol da Levedura n° 2 na pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de DMSO. Novamente, DMSO não teve efeito adverso no desempenho da levedura mesmo quando há duas ordens de concentração maiores em grandeza presentes do que se antecipa para a adição durante a prática desta invenção.

A figura 19 mostra a viabilidade da levedura n° 2 na pasta de milho contendo de 0 a 1200 ppm de NMP. A figura 20 mostra a produção de glicerol da levedura n° 2 na pasta de milho contendo 0 a 1200 ppm de NMP. A figura 21 mostra a produção de etanol da levedura 2 na pasta de milho contendo 0 a 1200 ppm de NMP. O declínio no desempenho da levedura com concentrações crescentes de NMP é evidente, onde o controle sem NMP proporcionou 10% de etanol em 48 horas enquanto a amostra com 1000 ppm de NMP proporcionou apenas 9,1% de etanol em 48 horas. A levedura 2 é mais afetada pela presença de NMP do que a levedura 1, embora a níveis similares de uso seguindo os métodos desta invenção, espera-se que mesmo o efeito de NMP na levedura 2 seja desprezível.

Apenas aspectos particulares desta invenção são ilustrados pelos exemplo supra, sendo que a invenção não pretende estar limitada a esses Exemplos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de controle de metabolismo de lactobacilos em pasta em uma instalação de produção de etanol, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionar
5 à pasta um líquido que tratamento que compreende:

1) ao menos um solvente orgânico, e

2) um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel em água, um agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente
10 insolúvel em água, ou ambos, dissolvidos no mesmo, sendo que o termo "substancialmente insolúvel em água" significa um agente antimicrobiano que tem uma solubilidade em água pura a 20°C de cerca de 0,1 grama por litro ou menos, sendo que o líquido orgânico compreende mais de 1 grama por litro do(s)
15 dito(s) agente(s) antimicrobiano(s) dissolvido(s) no mesmo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende virginiamicina, senduramicina, ou ambos.

20 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende monensina.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido orgânico compreende
25 ao menos um solvente orgânico aprótico dipolar, sendo que o dito líquido de tratamento compreende mais de 10 gramas por litro do dito agente antimicrobiano do tipo pristinamicina.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido orgânico compreende um sulfóxido de dialquila, e pirrolidonas de alquila, ou ambos, sendo que os grupos alquila são independentemente C₁ a C₄, sendo que o dito líquido de tratamento compreende mais de 10 grama por litro do dito agente antimicrobiano do tipo pristinamicina.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel em água.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o dito líquido de tratamento compreende mais de 10 gramas por litro do dito agente antimicrobiano do tipo pristinamicina.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o dito líquido de tratamento compreende mais de 50 gramas por litro do dito agente antimicrobiano do tipo pristinamicina dissolvido.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o dito líquido de tratamento compreende mais de 100 gramas por litro do dito agente antimicrobiano do tipo pristinamicina dissolvido.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende um agente

antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água.

11. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o dito líquido de tratamento
5 compreende mais de 10 gramas por litro do dito agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o dito líquido de tratamento
compreende mais de 50 gramas por litro do dito agente
10 antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter dissolvido.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o dito líquido de tratamento
compreende mais de 100 gramas por litro do dito agente
antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter dissolvido.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente orgânico
compreende ao menos um acetato de alquila, um lactato de
alquila, ou uma combinação destes, sendo que o dito líquido
de tratamento compreende mais de 50 gramas por litro do dito
20 agente antimicrobiano.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente orgânico
compreende um éster de alquila de C1 a C5 de um ácido
orgânico de C1 a C4, acetato de alquila onde a porção
25 alquila tem entre 1 a 4 átomos de carbono, lactato de
alquila onde a porção alquila tem entre 1 e 4 átomos de
carbono, N,N-dialquicapramida onde a porção alquila tem
entre 1 e 4 átomos de carbono, sulfóxido de dialquila onde

as porções alquila tem independentemente entre 1 e 4 átomos de carbono, N-alquilpirrolidona onde a porção alquila tem entre 1 e 4 átomos de carbono, pirrolidona, formamida de dialquila onde a porção alquila tem entre 1 e 4 átomos de carbono, acetona, isopropanol, um butanol, um pentanol, ou combinações dos mesmos.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido de tratamento compreende ao menos 70%, em peso, de etanol.

10 17. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido de tratamento compreende ao menos um solvente orgânico aprótico dipolar, ao menos um acetato de alquila, ao menos um lactato de alquila, ou uma combinação dos mesmos, sendo que o dito
15 líquido de tratamento compreende mais de 20 gramas por litro do dito agente antimicrobiano.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano substancialmente insolúvel em água compreende um agente
20 antimicrobiano do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel em água, sendo que o solvente orgânico compreende ao menos um acetato de alquila ou lactato de alquila onde a porção alquila contém entre 1 e 4 átomos de carbono.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente orgânico
25 compreende uma pirrolidona, uma amida ou um sulfóxido.

20. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido de tratamento

compreende ao menos 200 gramas do dito agente antimicrobiano dissolvido por litro.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente orgânico tem um ponto de fulgor em frasco fechado maior do que 93,3°C (200°F).

22. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a instalação de produção de etanol compreende um tanque dotado de uma porta de entrada e uma porta de saída e um trocador de calor dotado de uma porta de entrada e uma porta de saída conectado, de forma corrente, à porta de saída do dito tanque de tal modo que a pasta flua a partir do tanque até o trocador de calor, sendo que o método compreende adicionar à pasta em um ponto entre a porta de saída do tanque e a porta de saída do trocador de calor, sendo que o dito líquido de tratamento compreende mais de 10 gramas por litro do(s) dito(s) agente(s) antimicrobiano(s).

23. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito líquido de tratamento é adicionado por uma bomba de medição que bombeia o líquido de tratamento na dita pasta.

24. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente orgânico compreende sulfóxido de dimetila.

25. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente orgânico compreende N-metil-2-pirrolidona.

26. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano consiste, essencialmente, em um agente antimicrobiano do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel em água, um
5 agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água, ou ambos.

27. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido de tratamento compreende mais de 50%, em peso, de um ou mais solventes
10 orgânicos.

28. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido de tratamento é adicionado a um líquido aquoso que pode ser água ou pasta, sendo que o líquido de tratamento é adicionado ao líquido
15 aquoso sob alto cisalhamento, de tal modo que a dissipação do solvente resulte em um agente antimicrobiano molecular ou nanopartículas de agente antimicrobiano.

29. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a adição à pasta de um
20 líquido de tratamento erradica os acúmulos estabelecidos de lactobacilos, sendo que a adição de uma concentração idêntica de agente antimicrobiano em pó não erradicará os acúmulos estabelecidos de lactobacilos.

30. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano
25 consiste, essencialmente, em virginamicina, senduramicina, monensina, ou qualquer combinação dos mesmos.

31. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o líquido de tratamento encontra-se sob a forma de um gel à temperatura ambiente.

32. Método de erradicação de lactobacilos em
5 pasta em uma instalação de produção de etanol, **caracterizado** pelo fato de que a adição à pasta de um líquido de tratamento compreende:

- 1) ao menos um solvente orgânico, e
- 2) um agente antimicrobiano do tipo
10 pristinamicina substancialmente insolúvel em água, um agente antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água, ou ambos, dissolvidos no mesmo, sendo que o termo "substancialmente insolúvel em água" significa que o agente antimicrobiano tem uma solubilidade em água pura a
15 20°C de cerca de 0,1 grama por litro ou menor, sendo que o dito líquido orgânico compreende mais de 1 grama por litro do(s) dito(s) agente(s) antimicrobiano(s) dissolvido(s) no mesmo, sendo que em 6 horas de adição do líquido de tratamento à pasta, ao menos 90% dos lactobacilos
20 originalmente presentes não estão mais viáveis.

33. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que o agente antimicrobiano consiste, essencialmente, em virginiamicina, senduramicina, monensina, ou qualquer combinação dos mesmos.

25 34. Método de controle de microorganismos indesejados em pasta em uma instalação de produção de etanol, **caracterizado** pelo fato de que a adição à pasta de um líquido de tratamento compreende:

1) ao menos um solvente orgânico, e

2) um agente antimicrobiano do tipo
pristinamicina substancialmente insolúvel em água, um agente
antimicrobiano do tipo ionóforo de poliéter substancialmente
5 insolúvel em água, ou ambos, dissolvidos no mesmo, sendo que
o termo "substancialmente insolúvel em água" significa que o
agente antimicrobiano tem uma solubilidade em água pura a
20°C de cerca de 0,1 grama por litro ou menor, sendo que o
dito líquido orgânico compreende mais de 1 grama por litro
10 do(s) dito(s) agente(s) antimicrobiano(s) dissolvido(s) no
mesmo.

Contagem Associada de Lactobacilos

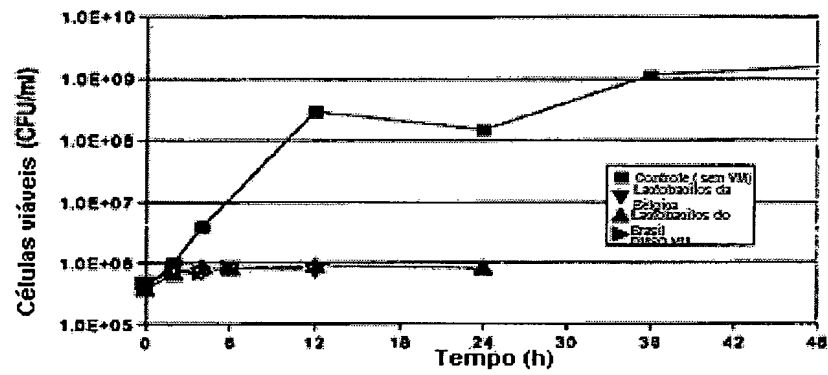


Figura 1

Contagem Associada de Lactobacilos

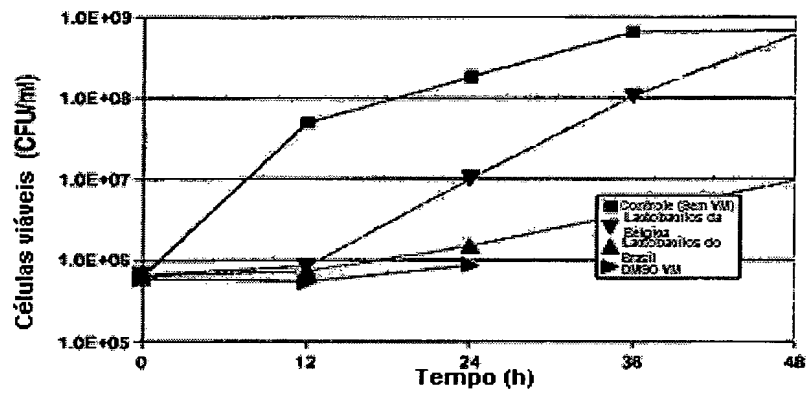


Figura 2

Contagem Associada de Lactobacilos

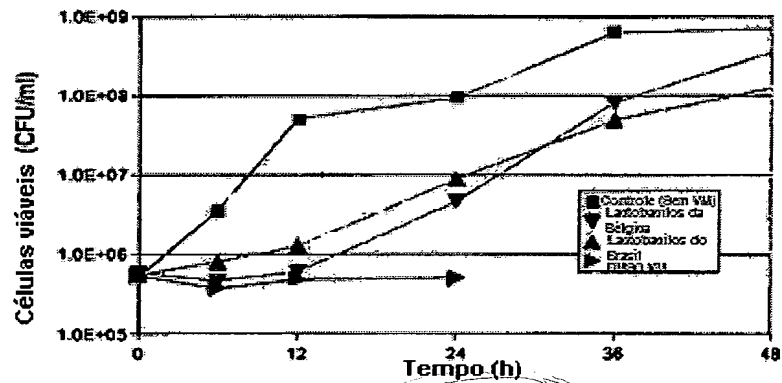


Figura 3

Levedura N° 1 Viabilidade com DMSO

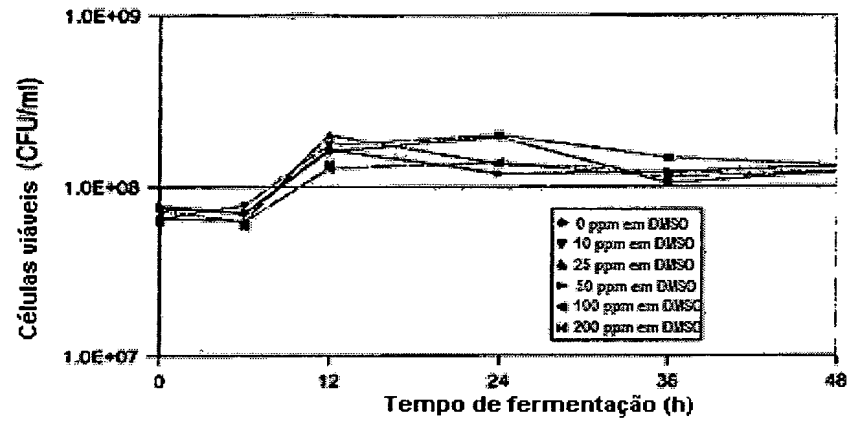


Figura 4

Levedura N° 1 Viabilidade com DMSO

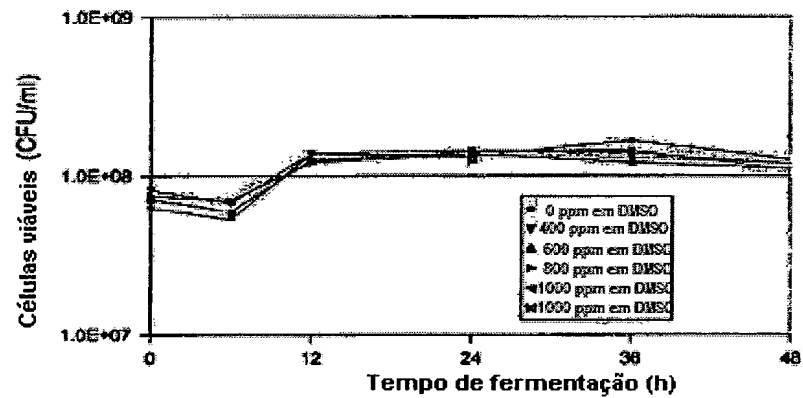


Figura 5

Concentração de Glicerol

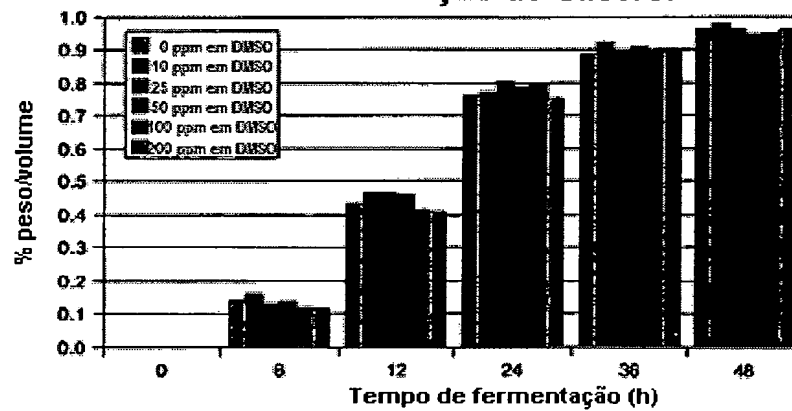


Figura 6

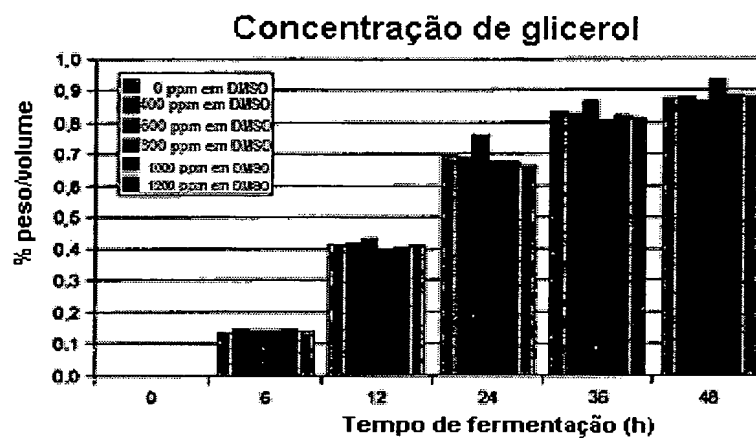


Figura 7

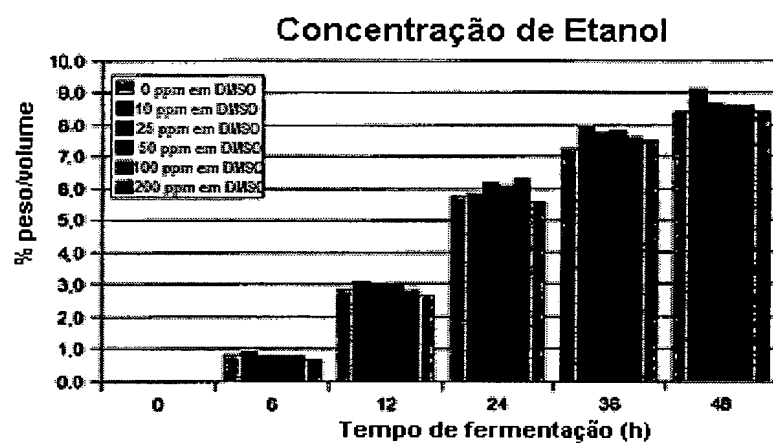


Figura 8

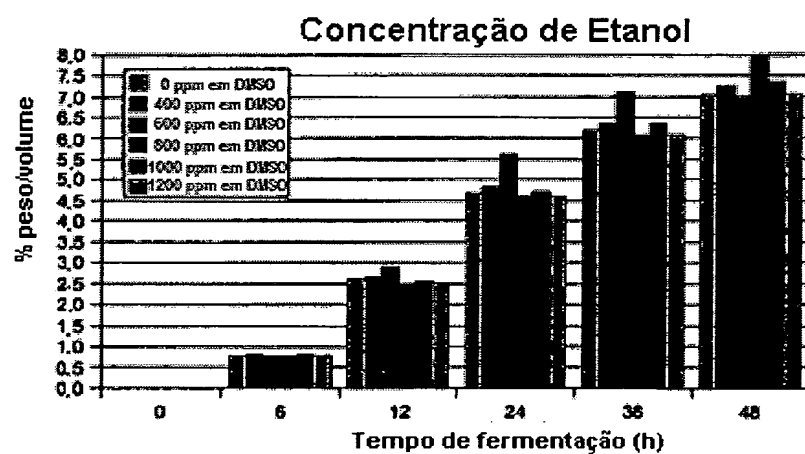


Figura 9

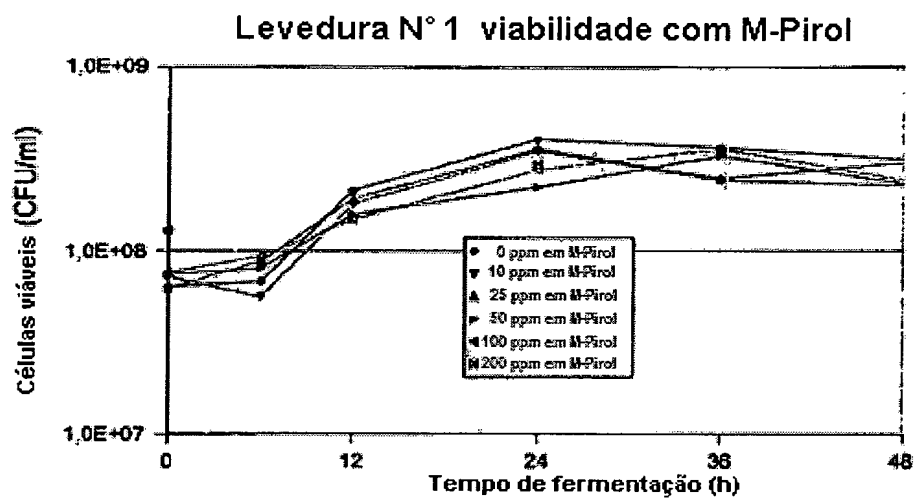


Figura 10

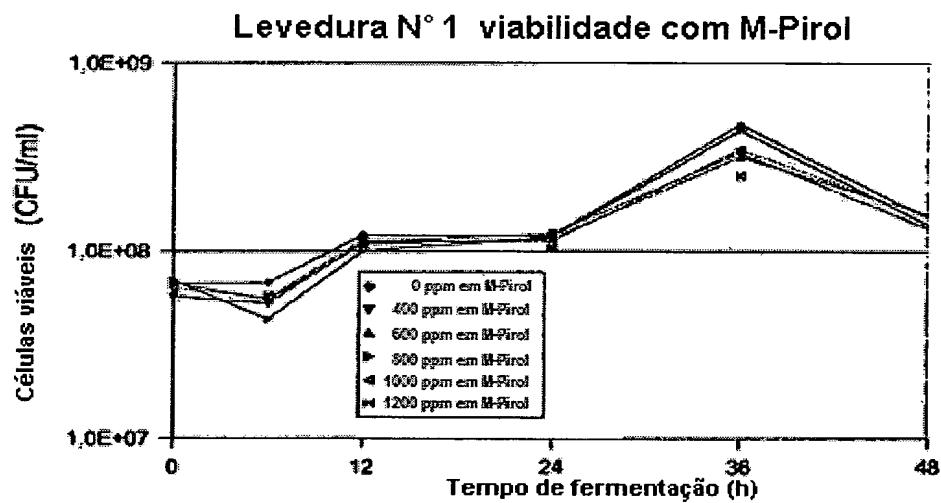


Figura 11

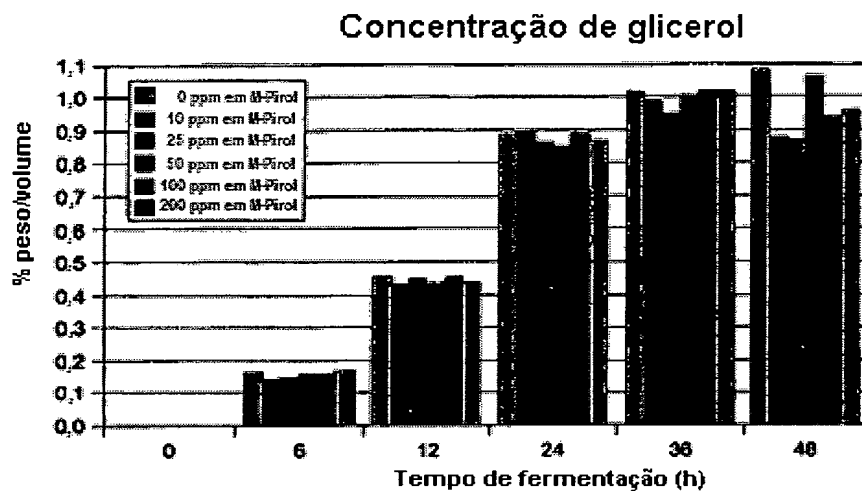


Figura 12

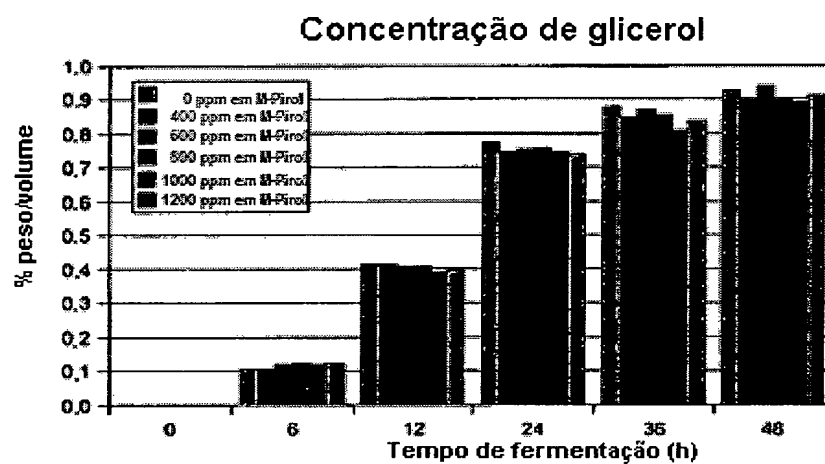


Figura 13

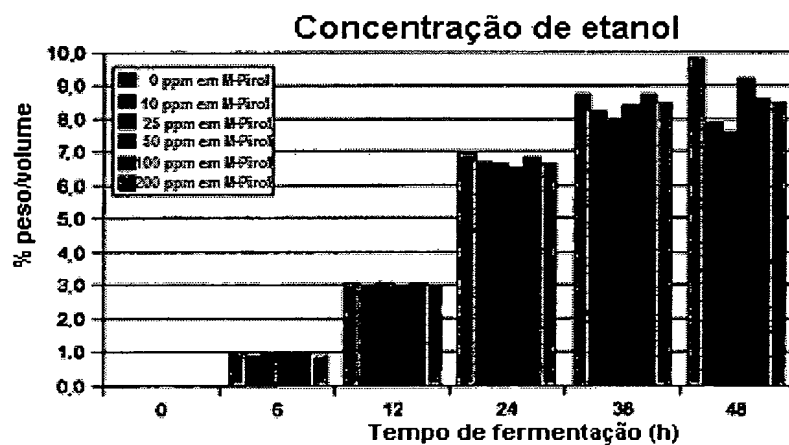


Figura 14

Concentração de etanol

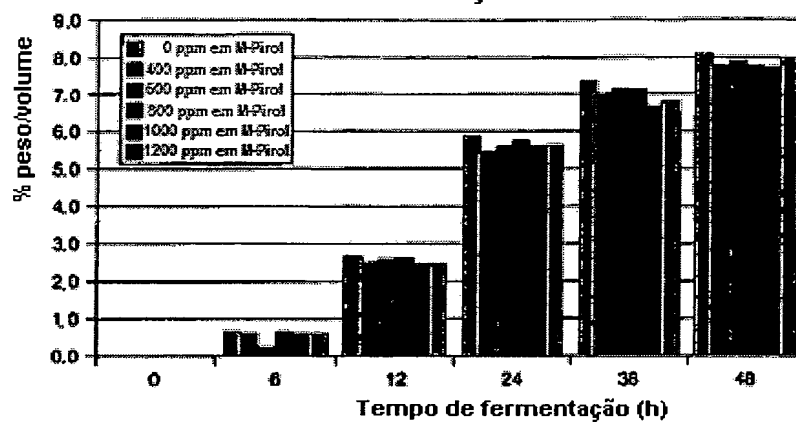


Figura 15

Levedura N° 2 - viabilidade com DMSO

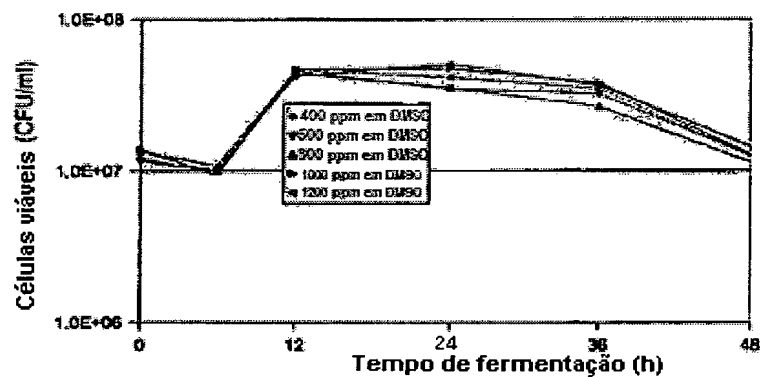


Figura 16

Concentração de Glicerol

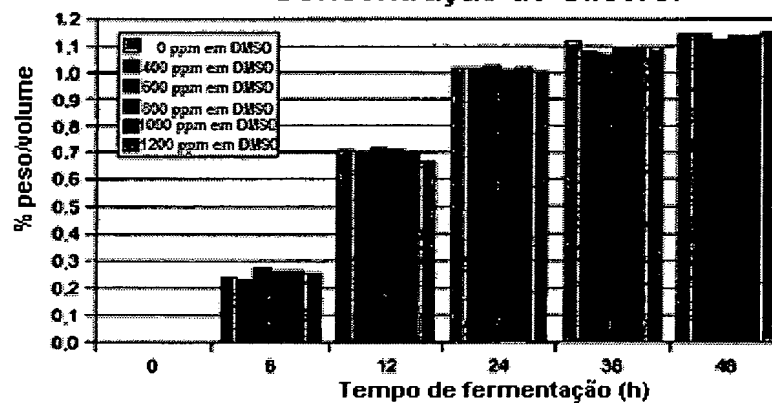


Figura 17

Concentração de Etanol

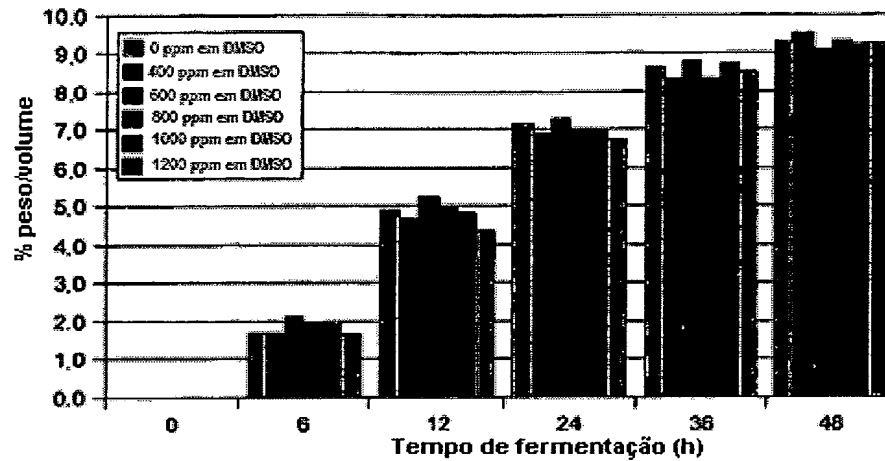


Figura 18

Levedura n° 2 - viabilidade com M-Pirol

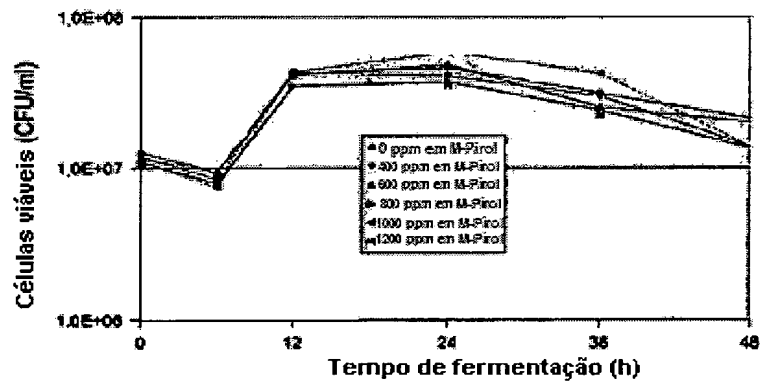


Figura 19

Concentração de Glicerol

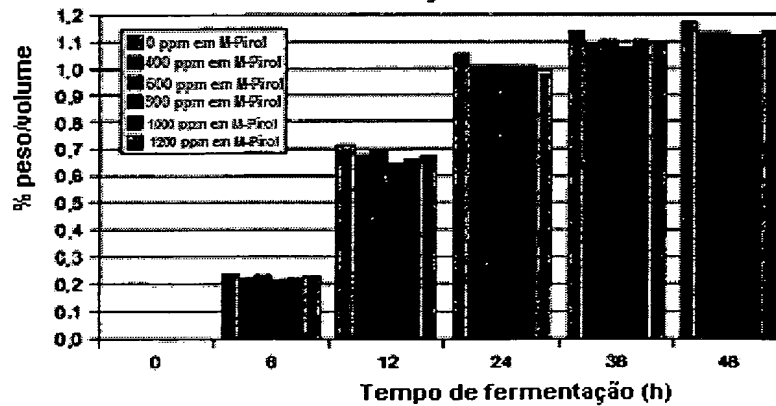


Figura 20

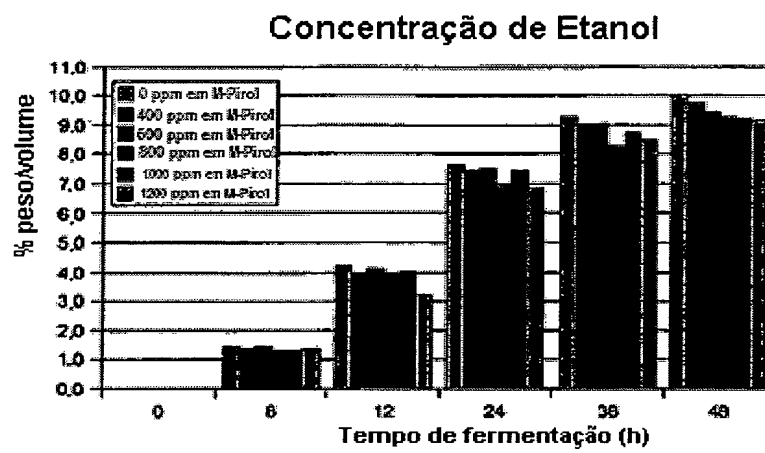


Figura 21

RESUMO

"MÉTODO DE CONTROLE DE METABOLISMO DE LACTOBACILOS EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL; MÉTODO DE ERRADICAÇÃO DE LACTOBACILOS EM PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL; E MÉTODO DE CONTROLE DE MICROORGANISMOS INDESEJADOS NA PASTA EM UMA INSTALAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ETANOL"

Trata-se de um método para o controle de microorganismos tal como metabolismo de lactobacilos em pasta em uma instalação de produção de etanol, que inclui a adição à pasta, de uma quantidade eficaz para o controle desses microorganismos de um ou mais agente(s) antimicrobiano(s) do tipo pristinamicina substancialmente insolúvel(eis) em água, um agente antimicrobiano com ionóforo de poliéter substancialmente insolúvel em água, ou ambos, sendo que o termo "substancialmente insolúvel em água" significa que o agente antimicrobiano possui uma solubilidade em água pura a 20°C de 0,1 g por litro ou menos, sendo que, pelo menos uma parte do(s) agente(s) antimicrobiano(s) substancialmente insolúvel(l, eis) é adicionada para a pasta na forma de : 1) um líquido orgânico compreendendo pelo menos um solvente orgânico com o(s) referido(s) agente(s) antimicrobiano(s) substancialmente insolúvel(eis) em água aí dissolvido(s), esse líquido orgânico compreendendo vantajosamente, mais do que 1 g por litro do(s) referido(s) agente(s) antimicrobiano(s); 2) partículas compostas do(s) referido(s) agente(s) antimicrobiano(s) substancialmente insolúvel(eis) em água

com um diâmetro médio ponderal inferior a $5\ \mu$; ou 3) ambos os itens supra.