

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 818**

21 Número de solicitud: 202330416

51 Int. Cl.:

A01N 33/00 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

25.05.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.09.2023

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

09.05.2025

Fecha de concesión:

05.06.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.06.2025

73 Titular/es:

BIO LOGIC CROP SCIENCE S.L. (100.00%)

C/ Amadeo de Saboya 1, 1

46010 Valencia (Valencia) ES

72 Inventor/es:

CASAÑA GINER, Víctor

74 Agente/Representante:

SOLER LERMA, Santiago

54 Título: **INCREMENTO DE PALATABILIDAD DE CEBOS DE INSECTOS CON INSECTICIDA**

57 Resumen:

En la presente invención se exponen compuestos que incrementan la ingesta de cebos insecticidas para insectos, así como la eficacia insecticida de los mismos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 948 818 B2

DESCRIPCIÓN

INCREMENTO DE PALATABILIDAD DE CEBOS DE INSECTOS CON INSECTICIDA

El uso de cebos insecticidas es una técnica usual de control de plagas, tanto en agricultura, zootecnia y veterinaria, como en hogares y zonas urbanas.

- 5 Uno de los constantes problemas es la búsqueda de nuevas formas de acción, de reducción de la carga medioambiental de insecticidas y de sustitución por compuestos naturales, o similares a los naturales que tengan un perfil medioambiental, toxicológico y ecotoxicológico aceptable o mejor que los existentes.

- 10 Una técnica conocida es en una trampa o recipiente conteniendo el cebo, se coloca un cebo alimentario y también una cantidad efectiva de insecticida de forma que cuando el insecto coma, sea intoxicado y muera, o bien inmediatamente (en minutos) o bien en horas o días (cuando el efecto pretenda ser retardado, de especial utilidad en cebos para hormigas que por trofolaxia van pasando el cebo ingerido a otras hormigas).

- 15 Existe una necesidad de disminuir la cantidad de compuestos tóxicos y ecotóxicos empleados para el control de plagas y este es uno de los problemas a resolver por la presente invención. De la misma forma, es un problema constante el mejorar la eficacia de los cebos insecticidas.

Cuanto más ingiere un insecto de un cebo, mayor es la cantidad de producto insecticida que llega a afectarle, con lo cual se maximiza el efecto insecticida sin tener que usar concentraciones elevadas de insecticida en los cebos.

- 20 La solución propuesta en la presente invención consiste en añadir a cebos usuales que llevan un insecticida usual, o cualesquiera otros que puedan ser usados, determinados compuestos que aumentan la palatabilidad del cebo, por lo tanto la ingestión del mismo cebo e insecticida, de forma que a dosis reducidas de insecticidas, se consigue la muerte de los insectos diana.

- 25 Algunos cebos están suplementados con proteínas, con supuesto aumento de palatabilidad, pero hasta la fecha no es conocido el aumento de palatabilidad con un aminoácido en concreto, en estado libre, sin formar parte de ninguna proteína, como es el caso de la serina en la presente invención e incluso de un isómero cíclico de la propia serina (cicloserina, en cualquier ratio de isómeros D y L, cuya actividad hemos observado que es la misma).

Los compuestos que han demostrado aumentar la palatabilidad los cebos de acuerdo con la presente invención son la serina, la cicloserina y la floxina B, así como la combinación sinérgica de dichos compuestos.

Las concentraciones a las cuales se observa un incremento de palatabilidad oscilan entre un 0.02% con respecto al total del peso del cebo a concentraciones mayores del 1%. Sin embargo, por simplificación y economía, es preferible aunque no necesario, limitar la concentración de serina (CAS No. 302-84-1), cicloserina (CAS No. 68-39-3, proporcionada por ejemplo por Sigma-Aldrich con nº de catálogo C7005) o de floxina B (CAS No. 18472-87-2) a igual o menos del 1%, en particular porque puede haber problemas de solubilidad en dichos cebos.

Para su utilización contra las hormigas, termitas, avispas, moscas, mosquitos, grillos, o cucarachas se utilizan preferiblemente los compuestos serina, cicloserina y/o floxina B en una composición cebo conteniendo insecticida.

De acuerdo con ES2347806T3 (Von Deyn et al., BASF, 2010) se pueden usar los compuestos serina, cicloserina y/o floxina B en los cebos descritos en dicha patente española.

El cebo puede ser una preparación líquida, sólida o semisólida (por ejemplo un gel). Los cebos sólidos se pueden formar en las distintas formas y modelos adecuados para la aplicación respectiva por ejemplo, gránulos, bloques, barras, discos. Los cebos líquidos se pueden cargar en varios dispositivos para asegurar la aplicación apropiada, por ejemplo, recipientes abiertos, dispositivos de aerosol, fuentes de goteo, o fuentes de evaporación. Los geles se pueden basar en matrices acuosas o aceitosas y se pueden formular para las necesidades particulares en términos de pegajosidad, retención de la humedad o características de envejecimiento.

El cebo empleado en la composición es un producto que es suficientemente atractivo para incitar a los insectos tales como las hormigas, termitas, avispas, moscas, mosquitos, grillos etc. o cucarachas a comer. El atractivo se puede manipular mediante al utilizar estimulantes de alimentación o feromonas sexuales. Los estimulantes para alimentación se escogen, por ejemplo, pero no exclusivamente, de proteínas de origen animal y/o vegetal (harina de carne, pescado o sangre, partes de insectos, yema de huevo), de grasas y aceites de origen animal y/o de origen vegetal o mono-, oligo- o poliorganoscáridos, especialmente de sacarosa, lactosa, fructosa, dextrosa, glucosa, almidón, pectina o aún melaza o miel. Las partes frescas o en descomposición de frutas, cultivos, plantas, animales, insectos o partes específicas de los mismos también pueden servir como un estimulante de alimentación. Las feromonas sexuales se conocen por ser más específicas a los insectos. Las

feromonas específicas, se describen en la literatura y se conocen por aquellos expertos en la técnica. No obstante, no se conocen feromonas atrayentes potentes para hormigas o cucarachas.

Metodología en los ensayos:

Hormigas: Los ensayos se realizan en cajas de plástico transparente cubierta en la parte superior con una mezcla de etanol y talco (talcol) que impide que las hormigas huyan. Una gota de cebo se coloca sobre un porta, y éste se coloca con 10-30 hormigas y se observa el comportamiento de las mismas.

Se hace el conteo de las hormigas que comen cebo cada minuto hasta los 10' y cada 5 minutos hasta los 30'. Las cajas con hormigas se guardan con la muestra, con una fuente de humedad y alimento alternativo para observar la mortalidad a las 24 horas y a las 48 horas.

Cucarachas: El protocolo de ensayo con cucarachas, que puede ser realizado en cualquier lugar con condiciones usuales de temperatura y humedad y con cucarachas obtenidas en campo -o bien criadas en insectario-, consiste en recolectar cucarachas que se privan de alimento durante 7 días; en el día del ensayo se introducen 4 hembras y 4 machos (o bien el número deseado, para mediciones individuales, solo un individuo) en cajas en las que se sitúa el cebo en una cantidad conocida y se hace en conteo de visitas al cebo cada cierto tiempo, opcionalmente se determina la cantidad ingerida cada hora o ciertos minutos por pesada diferencial. En los ejemplos en los que se atiende a la mortalidad, se observa el número de individuos volteados a la hora (u otro tiempo definido). Se extrae el cebo y se reemplaza con un cebo estándar -como bien puede serlo comida de perro en gránulos y una fuente de agua, como algodón humedecido- y se va observando durante una semana la mortalidad diaria.

Moscas: Se adiciona el cebo al 10% en agua que emplean las moscas para beber, situadas en mallas de cría corriente, de 10 x 10 x 10 cm³, ad libitum.

Mosquitos: Se adiciona el cebo al 10% en agua que emplean los mosquitos para beber, situadas en mallas de cría corriente, de 10 x 10 x 10 cm³, ad libitum.

En todos los insectos mencionados, se han tratado insectos en fase adulta.

Ejemplo 1.

En este ejemplo se muestran cebos alimenticios cuya ingestión aumenta por el hecho de llevar componentes seleccionados. Esto es, el efecto incrementar la palatabilidad por sí misma, es per se un efecto deseable, que puede ser necesario para combinarlo con un insecticida, o bien, para

incrementar la ingestión de un cebo por motivos que puedan no ser de exterminio o insecticida (por ejemplo, para el estudio de metabolitos en insectos de productos ingeridos en cebo, sean marcados radioactivamente o no).

5 Es de notar que es extremadamente difícil medir el peso de cebo ingerido por 10 a 30 hormigas en el periodo razonable de ensayo de 45 minutos. Por un lado, los cebos pueden adquirir agua del ambiente, o evaporarse al ambiente (dependerá en suma medida de la cantidad de compuestos higroscópicos que lleven y su capacidad de retener o liberar agua, así como de mantener un equilibrio, como es el caso de azúcares), por otro lado, las hormigas pueden llevar cebo adherido en el cuerpo, así mismo, las deposiciones que puedan dejar las hormigas en las cajas de ensayos son
10 difíciles de cuantificar (por ejemplo, si se quitan las hormigas y se pesa el cebo con la caja menos las hormigas).

Es por ello que con medios limitados de ensayo, es perfectamente detectable la palatabilidad por el número de hormigas que están comiendo simultáneamente del cebo, o que están dispuestas en esa posición, ya que por ensayos previos, realizados con multitud de repeticiones, esta forma de
15 evaluación de la palatabilidad se corresponde directamente proporcional a los gramos totales ingeridos. Por observación y experimentación, tampoco es necesario identificar las hormigas que están consumiendo en un momento dado y si son éstas u otras las que vuelven al cebo, ya que aunque sean solo pocas las hormigas que están comiendo, por el mecanismo de trofolaxia, el cebo se va transfiriendo de unas hormigas a otras, por lo general, de las más saciadas a las menos.

20 Formulación C.1.1 -no objeto de la invención, control-

Sacarosa: 20 %

Glucosa: 20 %

Fructosa: 10 %

Agua: 50 %

25 Formulación P.1.1 -de acuerdo con la invención-

Sacarosa: 20 %

Glucosa: 20 %

Fructosa: 10 %

Agua: 49.5 %

Cicloserina 0.5 %

Formulación P.1.2 -de acuerdo con la invención-

Sacarosa: 20 %

Glucosa: 20 %

5 Fructosa: 10 %

Agua: 49.5 %

Floxina B 0.5 %

Formulación P.1.3 -de acuerdo con la invención-

10 Sacarosa: 20 %

Glucosa: 20 %

Fructosa: 10 %

Agua: 49 %

Cicloserina 0.5 %

15 Floxina B 0.5 %

Resultados del Ejemplo 1 en *Lasius niger*, en términos de palatabilidad.

Test 1A - *Lasius niger*

Minute	n = 10 hormigas			
	Palatabilidad en términos de hormigas que visitan el cebo			
	C.1.1	P.1.1	P.1.2	P.1.3
0	1	0	0	0
5	0	2	0	4
10	1	3	2	3
15	2	2	3	3

ES 2 948 818 B2

20	0	1	4	5
25	3	2	1	2
30	1	4	6	6
35	1	5	2	2
40	0	1	4	5
45	0	3	6	1
50	0	2	1	3
55	1	0	0	2
60	0	0	0	2
TOTAL SUM	10	25	29	38

Se observa que en los tres casos de realización de la invención, la palatabilidad se ha incrementado en un 250% a un 380%, siendo máxima a igualdad de concentración en P.1.3, indicativo de un efecto
5 sinérgico en la combinación.

Resultados del Ejemplo 1 en *Linepithema humile*, en términos de palatabilidad.

Test 1B - *Linepithema humile*

Minuto	n = 10 hormigas			
	Palatabilidad en términos de hormigas que visitan el cebo			
	C.1.1	P.1.1	P.1.2	P.1.3
0	0	0	1	1
5	1	1	1	1
10	0	0	3	1
15	0	4	1	2
20	1	2	0	0
25	2	2	1	2
30	0	3	2	1
35	3	1	3	5

40	2	1	0	2
45	0	2	0	3
50	0	1	0	1
55	0	0	2	2
60	0	0	1	1
TOTAL SUM	9	17	15	22

Se repiten la tendencia de los resultados obtenidos en *Lasius niger*, aunque en esta ocasión la cantidad total de hormigas dispuestas.

- 5 Por otro lado (resultados no mostrados), cuando en el cebo se emplea serina en lugar de cicloserina, también se observa un incremento de la palatabilidad aunque algo menor, de alrededor de 1.5 - 1.7 veces frente al control, y cuando se combina serina, cicloserina y floxina B, o serina y floxina B, dicho incremento es de 1.7 - 1.8 veces frente al control, sin diferencias apreciables entre esas dos últimas combinaciones.

10

Ejemplo 2.

Un ensayo similar se realizó con cucarachas *Periplaneta americana*, *Blattella germanica* y *Blatta orientalis*, según se detalla a continuación para la primera especie. En este caso, sí se pudo evaluar la cantidad de cebo ingerido por individuo, correspondiendo las fórmulas de este ejemplo las del

- 15 Ejemplo 1, pero sustituyendo el 20 % de fructosa en todas ellas por un 20 % de crema de avellanas comercial, de forma que tenemos las formulaciones C.2.1, P.2.1, P.2.2, P.2.3 con ese cambio solamente.

Test 2A - *Periplaneta americana*

	n = 8 cucarachas			
	Palatabilidad en gramos ingeridos			
Minuto	C.2.1	P.2.1	P.2.2	P.2.3

60	0.3	0.4	0.6	1.0
120	0.6	1.2	0.8	1.4
180	1.0	3.1	1.4	2.9
240	2.1	3.5	2.4	3.9

El efecto es más acentuado en el cebo con cicloserina, y en la combinación de cicloserina y floxina B.

Igualmente (resultados no mostrados), se observa que la serina también incrementa la palatabilidad, pero en menor medida que la cicloserina.

- 5 Es por ello que una realización preferente de la invención es aquella con mejores resultados, esto es, con cicloserina y/o floxina B.

Es notable que el efecto de incremento de la palatabilidad ocurra en especies distintas, hasta nivel de género, subfamilia, familia, y hasta orden, de la clase Insecta. Es esperable que este efecto se repita de forma generalizada, con las exclusiones pertinentes, en toda la clase Insecta (insectos), siendo
10 sencillo el comprobar su efecto a partir de las ideas vertidas en la presente invención, simplemente proporcionando cebos adecuados adaptados a cada especie y eliminando las especies u otro nivel taxonómico mediante sencillos ensayos de prueba y error sin actividad inventiva alguna, al menos referida para la comprobación de la palatabilidad de serina, cicloserina y/o floxina B.

Otro aspecto de la invención es la combinación de serina, cicloserina y/o floxina B con cebos que
15 contienen un insecticida. El hecho de que los insectos consuman más cebo parece favorecer que la cantidad de insecticida ingerido también aumente y por tanto se consiga la mortalidad del insecto diana con menor concentración de insecticida.

Los insecticidas que pueden ser combinados con serina, cicloserina y/o floxina B de acuerdo con la presente invención están descritos en el siguiente párrafo, en su caracterización internacional en
20 inglés, y según clases definidas por la organización:

Insecticidas: A0) varios insecticidas, incluidos agrigata, al-fosfuro, amblyseius, aphelinus, aphidius, aphidoletes, artimisinin, autographa californica NPV, azociclotina, Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis subsp. aizawai, Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki, Bacillus thuringiensis, Beauveria, Beauveria bassiana, betaciflutrina, biológicos, bisultap, broflutrinato, bromofos-e, bromopropilato,
25 Bt-Corn-GM, Bt-Soya-GM, capsaicina, cartap, celastrus-extract, clorantraniliprol, clorbenzurón, cloretoxifos, clorofluazurón, clorpirifos-e, cnidiadin, criolita, cianofós, ciantraniliprol, ciclaniliprol, cihalotrina, cihexatina, cipermetrina, dacnusa, DCIP, dicloropropeno, dicofol, diglifo, diglifo+dacnusa,

dimethacarb, dithioether, dodecyl-acetate, emamectin, encarsia, EPN, eretmocerus, ethylene-dibromide, eucalyptol, fatty-acids, fatty-acids/salts, fenazaquina, fenobucarb (BPMC), fenpiroximato, flubrocitrinato, flufenzina, flupiradifurona, formetanato, formotión, furatiocarb, gamma-cihalotrina, ajo-jugo, virus de la granulosis, harmonia, heliothis armigera NPV, bacteria inactiva, ácido indol-3-ilbutírico, yodometano, hierro, isocarbofos, isofenfos, isofenfos-m, isoprocarb, isotioato, caolín, lindano, liuyangmicina, matrina, mefosfolán, metaldehído, metarhizium-anisopliae, metamidofos, metolcarb (MTMC), aceite mineral, mirex, m-isotiocianato, monosultap, myrothecium verrucaria, naled, neochrysocharis formosa, nicotina, nicotinoides, aceite, ácido oleico, ometoato, orius, oximatrina, paecilomyces, aceite de parafina, paratión-e, pasteuria, aceite de petróleo, feromonas, ácido fosforoso, fotorhabdus, foxim, fitoseiulus, pirimifos-e, aceite vegetal, plutella xylostella GV, virus de la poliedrosis, extractos de polifenoles, oleato potásico, profenofós, prosuler, protiofós, piraclofós, piretrinas, piridafentiión, pirimidifeno, piriproxifeno, extracto de quillay, quinometionato, aceite de colza, rotenona, saponina, saponozit, compuestos de sodio, fluosilicato de sodio, almidón, steinernema, estreptomicetos, sulfluramida, azufre, tebupirimfos, temefós, tetradifón, tetraniliprol, tiofanox, tiometón, transgénicos (p. ej. g., Cry3Bb1), triazamato, trichoderma, trichogramma, triflumurón, verticillium, vertrina, insecticidas isoméricos (por ejemplo kappa-bifentrina, kappa-teflutrina), dicoromezotiaz, broflanilida, piraziflumida; A1) la clase de los carbamatos, incluidos el aldicarb, el alanicarb, el benfuracarb, el carbaril, el carbofurano, el carbosulfán, el metiocarb, el metomilo, el oxamilo, el pirimicarb, el propoxur y el tiodicarb; A2) la clase de los organofosforados, incluidos el acefato, el azinfos-etilo, el azinfos-metilo, el clorfenvinfos, el clorpirifos, el clorpirifos-metilo, el demeton-S-metilo, el diazinón, el diclorvos/DDVP, el dicrotofos, el dimetoato, el disulfotón, el etiión, el fenitrotión, el fentiión, el isoxatiión, malatiión, metamidafos, metidatiión, mevinfos, monocrotofos, oximetoato, oxidemetón-metilo, paratiión, paratiión-metilo, fentoato, forato, fosalón, fosmet, fosfamidón, pirimifós-metilo, quinalfos, terbufós, tetraclorvinfos, triazofós y triclorfón; A3) la clase de los compuestos organoclorados de ciclodieno, como el endosulfán; A4) la clase de los fiproles, incluidos el etiprol, el fipronil, el pirafluprol y el piriprol; A5) la clase de los neonicotinoides, incluidos el acetamiprid, la clotianidina, el dinotefuran, el imidacloprid, el nitenpyram, el tiacloprid y el tiametoxam; A6) la clase de los espinosinos, como el espinosad y el espinetoram; A7) los activadores de los canales de cloruro de la clase de las mectinas, como la abamectina, el benzoato de emamectina, la ivermectina, la lepimectina y la milbemectina; A8) imitadores de hormonas juveniles como hidropreno, kinopreno, metopreno, fenoxicarbo y piriproxifeno; A9) bloqueadores selectivos de la alimentación de homópteros como pimetrozina, flonicamida y pirifluquinazón; A10) inhibidores del crecimiento de ácaros, como clofentezina, hexitiazox y etoxazol; A11) inhibidores de la ATP sintasa mitocondrial, como diafentiurón, óxido de fenbutaestán y propargita; desacopladores de la

fosforilación oxidativa, como el clorfenapir; A12) bloqueantes de los canales del receptor nicotínico de la acetilcolina, como el bensultap, el clorhidrato de cartap, el tiociclam y el tiosultap sódico; A13) inhibidores de la biosíntesis de la quitina de tipo 0 de la clase de las benzoilureas, como el bistriflurón, el diflubenzurón, el flufenoxurón, el hexaflumurón, el lufenurón, el novalurón y el teflubenzurón; A14) inhibidores de la biosíntesis de quitina de tipo 1, como la buprofezina; A15) disruptores de la muda, como la ciromazina; A16) agonistas de los receptores de ecdyson, como la metoxifenoza, la tebufenoza, la halofenoza y la cromafenoza A17) agonistas de los receptores de la octopamina, como el amitraz; A18) inhibidores del transporte de electrones del complejo mitocondrial piridaben, tebufenpirad, tolfenpirad, flufenerim, cienopirifen, ciflumetofen, hidrametilnón, acequinocilo o fluacipirim; A19) bloqueantes de los canales de sodio dependientes de voltaje, como el indoxacarb y la metaflumizona; A20) inhibidores de la síntesis lipídica, como el espiroclifeno, el espiromesifeno y el espirotetramat; A21) moduladores de los receptores de rianodina de la clase de las diamidas, incluida la flubendiamida, los compuestos de ftalamida (R)-3-cloro-N1-{2-metil-4-[1,2,2,2-tetrafluor-1-(trifluormetil)etil]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfonil)ftalamida y (S)-3-cloro-N1-{2-metil-4-[1,2,2,2-tetrafluor-1-(trifluormetil)etil]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfonil)ftalamida, clorantraniliprol, ciclaniliprol y ciantraniliprol; A22) compuestos de modo de acción desconocido o incierto, como azadiractina, amidoflomet, bifenazato, fluensulfona, butóxido de piperonilo, piridalilo, sulfoxaflor; o A23) moduladores de los canales de sodio de la clase de los piretroides, incluidos acrinatrina, alletrina, bifentrina, ciflutrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, zeta-cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, etofenprox, fenpropatrina, fenvalerato, flucitrinato, tau-fluvalinato, permetrina, silafluofeno, teflutrina y tralometrina.

En particular, los insecticidas preferidos para ser usados en combinación según la presente invención son de la clase de piretrinas, 1R-trans-fenotrina, praletrina, permetrina, alfa-cipermetrina, cipermetrina, beta-cipermetrina, zeta-cipermetrina, aletrina, bioresmetrina, empentrina, bifentrina, lambda-cihalotrina, cihalotrina, supercihalotrina, D-tetrametrina, tetrametrina, abamectina, ivermectina, spinosad, fipronil.

Sorprendentemente se ha observado que la cantidad de ingrediente activo se puede reducir hasta 10-100 veces y mantener la eficacia, esto es, que el aumento de palatabilidad no solo favorece la mayor ingesta de cebo, sino que por alguna razón desconocida, los insectos también mueren con cantidades más pequeñas de insecticida.

Es notable remarcar que los ensayos realizados en el curso de estas investigaciones se han realizado en condiciones de ausencia de luz natural, y además en semioscuridad u oscuridad completa mediante cubrimiento de las cajas de ensayo con plástico negro en la mayoría de casos. Es por ello que debemos descartar que lo observado en la presente invención se deba a la fototoxicidad conocida de la floxina B. Por otro lado, ni la serina ni la cicloserina nunca se ha descrito como insecticida per se, a lo sumo se ha sugerido que los aminoácidos (ciclados o no), atendiendo a su afectación de la actividad de ciertas enzimas, afecta por ejemplo a mosquitos alimentados con sangre. Esto es, se descarta que el efecto en la mortalidad se vea influenciado por el uso de aminoácidos.

10 Ejemplo 3.

Para comprobar el efecto de combinación de cicloserina y/o floxina con insecticidas conocidos usados en cebos, usamos una composición tipo cebo de hormigas y sus equivalentes del Ejemplo 1, pero conteniendo un 0.01 % en peso del insecticida imidacloprid. También paralelamente se probó serina en lugar de cicloserina.

Composición del cebo

	C.3.1	P.3.1	P.3.2	P.3.3
Imidacloprid	0.01	0.01	0.01	0.01
Miel	90.00	89.2	89.2	89.2
Agua	9.99	9.99	9.99	9.99
Cicloserina	0.00	0.8	0	0.4
Floxina B	0.00	0	0.8	0.4

15

El cebo se les ofrece, en cajas conteniendo 10 hormigas *Lasius niger* cada una, por espacio de 3 horas, durante las cuales se observa la palatabilidad.

	n = 10 hormigas por 3 horas			
	Palatabilidad en términos de hormigas que visitan el cebo			
	C.3.1	P.3.1	P.3.2	P.3.3

TOTAL

SUM	15	31	25	35
-----	----	----	----	----

Es conocido que el imidacloprid a la dosis mencionada no provoca un rechazo del cebo, lo cual observamos aquí también.

Considerando que la ingestión está multiplicada por al menos un factor de 2, obtenemos que cada
5 insecto va a morir de manera aproximadamente similar con cebos con aumento de palatabilidad
conteniendo la mitad o menos de insecticida.

Puesto que los cebos suelen tener una vida útil una vez abiertos (sobre todo debido a la pérdida de
humedad que también es un factor de atracción) más bien corta (semanas o pocos meses) y la
práctica general es sobredimensionar la cantidad de cebo, mediante el empleo de la presente
10 invención se podría reducir la cantidad de insecticida por unidad de peso de cebo sin tener
consecuencias negativas sobre la eficacia.

Ejemplo 4.

En el presente ejemplo mostramos diferentes cebos de hormigas probadas en cajas de 10 individuos
15 de *Linepithema humile*.

Composición
del cebo

	C.3.1	C.3.2	P.3.1	P.3.2	P.3.3	P.3.4	P.3.5	P.3.6
1R-trans-								
Fenotrina	0.0100	0.0000	0.0100	0.0100	0.0100	0.0050	0.0010	0.0010
Prallethrin	0.0010	0.0000	0.0010	0.0010	0.0010	0.0005	0.0001	0.0001
Mezcla de								
azúcar	89.0000	89.0000	89.0000	89.0000	89.0000	89.0000	89.0000	89.0000
Mezcla								
emulsionante	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000
Goma natural	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000

ES 2 948 818 B2

Agua	9.9890	10.0000	9.1890	9.1890	9.1890	9.1945	9.1989	9.1989
Cicloserina	0.0000	0.0000	0.8000	0.0000	0.4000	0.8000	0.8000	0.4000
Floxina B	0.0000	0.0000	0.0000	0.8000	0.4000	0.0000	0.0000	0.4000
	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000

Mezcla de azúcares, como por ejemplo, jarabe invertido de glucosa con miel en una proporción de 10 a 1.

Mezcla de emulsificantes, como por ejemplo alcohol etoxilado C10-C14, aceite de ricino etoxilado y Tween 80 o similares, en proporciones, por ejemplo 1 a 1 a 1.

La goma natural puede ser por ejemplo, goma arábica, goma xantana, carragenato, etc.

La mortalidad acumulada en 24 es completa (prácticamente 100% en todos los casos, con variabilidad natural ensayo), incluso en aquellos casos en los que se ha dividido por diez el % en ingredientes activos.

10

Horas	Mortalidad - Acumulada							
	C.3.1	C.3.2	P.3.1	P.3.2	P.3.3	P.3.4	P.3.5	P.3.6
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	1	0	2	1	2	2	1	0
1	2	0	2	3	3	2	3	2
4	3	0	4	4	4	3	3	2
8	3	0	4	5	5	5	4	4
12	4	0	5	5	6	5	6	5
24	9	0	10	10	10	9	10	10

Resultados muy similares ocurren en ensayos tanto con cucarachas (*Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*), con mosquitos (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens*) y con moscas (*Musca domestica*, *Ceratitis capitata*) que por brevedad no se adjuntan.

En el caso de ensayos con mosquitos, el cebo se les da ad libitum a 50 ejemplares en jaulas de tela de 10 cm x 10 cm x 10 cm³, mediante un algodón impregnado conteniendo los cebos mencionados, pero cuyo contenido en la mezcla de azúcares es de solo el 10%, el resto se compensa añadiendo

más agua en la fórmula, de forma que sea lo suficientemente líquido para ser absorbido por los mosquitos.

Similarmente se han realizado ensayos como con mosquitos, pero con moscas caseras (*Musca domestica*) y con moscas del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*).

5 Tenemos pues que tanto en órdenes distintos de insectos (Diptera, Blattodea, Hymenoptera) la eficacia de las formulaciones de acuerdo con la presente invención es completa, tanto en términos de incremento de la palatabilidad de la floxina B, de la cicloserina (sea L-cicloserina, D-cicloserina o sus mezclas en cualquier ratio, incluyendo la mezcla racémica ya que en ensayos más detallados no hemos visto una actividad de un isómero mayor que el otro), o de la combinación de floxina B y
10 cicloserina.

La floxina B no está descrita como insecticida eficaz en condiciones de oscuridad o semioscuridad, ya que su mecanismo de acción bien conocido es por fotooxidación, en particular bajo la acción de la luz del sol. La cicloserina tampoco está descrita como insecticida, a lo sumo se conoce que interactúa en el metabolismo de los músculos en hembras de *Aedes aegypti* (comunicación personal) cuando son
15 alimentadas con sangre.

Por otro lado, se investigó, en adición al efecto de incremento de la palatabilidad, el efecto sobre la mortalidad de las composiciones conteniendo D-cicloserina, L-cicloserina y DL-cicloserina.

En este punto, nos encontramos con la situación inesperada, no observada en ensayos anteriores porque no es usual determinar la muerte al poco tiempo de la exposición al cebo (e.g., desde unos
20 minutos a un máximo de 24 horas), de que los cebos conteniendo cicloserina exclusivamente como ingrediente activo (esto es, en una simplificación conceptual, agua, azúcar y cicloserina, o incluso agua con cicloserina), tanto D-cicloserina como L-cicloserina o sus mezclas en cualquier ratio, presentan mortalidad retardada, llegando a la eliminación de los insectos que han comido hasta en un plazo de 7 días.

25 Esta circunstancia, además del uso de cicloserina para aumentar la palatabilidad de los cebos, hace que la cicloserina pueda ser usada como insecticida y además con una particularidad infrecuente, o incluso desconocida, en el control de plagas, esto es: los insectos tratados mueren a tiempos extraordinariamente (relativamente) largos de hasta 7 días. Esto, que en principio puede parecer una
30 desventaja, no lo es en ciertos casos, puesto que permite que por trofolaxia, las hormigas tengan más tiempo de vivir funcionalmente bien, sin signos externos de intoxicación que pudieran advertir a otras hormigas, y llegar a transmitir por trofolaxia el cebo a la hormiga reina (u hormigas reina de un

- mismo hormiguero, cuando es el caso) y así acabar de forma más efectiva con el hormiguero. Similarmente, la alerta que pueda provocar (de existir) sobre sus congéneres una cucaracha muerta cerca del cebo, se suprime. Adicionalmente, es conocido que las cucarachas son caníbales en ausencia de alimento alternativos, y hemos podido comprobar que el efecto mortal de la cicloserina en una cucaracha, se transfiere a otra cucaracha si a esta última se le ofrece una cucaracha tratada con cicloserina -moribunda (el canibalismo ocurre fundamentalmente sobre las cucarachas que están volteadas o afectadas de alguna forma)-. De igual forma, para control de plagas a largo plazo, la inmediatez no es un requisito insalvable, por lo tanto también es de aplicación en control de mosquitos para evitar transmisión de enfermedades o bien, en control de plagas en agricultura.
- 10 El uso experimental en enzimología de L-cicloserina en la influencia del metabolismo de proteínas de sangre y regulación de amoníaco y también con suplementación de glucosa, en condiciones de cría de laboratorio con hembras de *Aedes aegypti*, es conocido. Sin embargo, en ningún documento se muestra que la cicloserina, tanto L como D, es capaz de inducir la muerte sin intervención de una dieta proteica o que pueda ser utilizada como mecanismo de control de plagas a medio-largo plazo.
- 15 El estudio enzimático de transaminasa glutámico-pirúvica en realidad no explicaría la mortalidad inesperada en insectos en los que no se les ha aportado dieta proteica concomitantemente con D- o L- cicloserina, o bien, en ausencia de la misma.

Ejemplo 5

- 20 Siguiendo la estructura de los ensayos ya expuesta detalladamente, un ejemplo de eficacia con distintas especies se puede mostrar aquí:

Formulación A

Componente	% in w/w
D-cicloserina	1
Agua	89
Sacarosa	10
TOTAL	100

Formulación B 2

ES 2 948 818 B2

	% in
Componente	w/w
1R-trans-fenotrina	0.01
Miel	90.00
Agua	9.89
Cicloserina	0.10
TOTAL	100.00

Formulación C

	% in
Componente	w/w
Cipermetrina	0.1
Mezcla de azúcares	50
Mezcla emulsionante	0.3
Goma natural	0.3
Agua	49.2
Cicloserina	0.05
Floxina B	0.05
TOTAL	100

Tras el procedimiento indicado, solo que usando 10 individuos de cada especie, en su caso, la mitad hembras y la mitad machos), el 100% de mortalidad (tras un periodo de exposición de 48 horas a los cebos ad libitum) orientativo se alcanza a:

- 5 Periplaneta americana: 6 días
- Aedes albopictus: 5 días
- Musca domestica: 7 días
- Ceratitis capitata 8 días
- Lasius niger 7 días
- 10 Estando los insectos control en las mismas condiciones pero con cebos sin cicloserina, floxina B o insecticidas y compensado al 100% con adición de agua, y no superando en ningún caso el 20% de mortalidad.

Según nuestra experiencia, el uso de cicloserina como insecticida parece ser, al menos, de gran eficacia en *Lasius niger*, *Linepithema humile*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae*, *Musca domestica*, *Simuliidae ssp.*, *Ceratitis capitata*, *Bactrocera oleae*, *Bactrocera cucurbitae*.

Dado el efecto existente de la cicloserina (en ensayos más detallados no hubo diferencias significativas en la muerte ni duración con D-cicloserina, con L-cicloserina o mezclas de ambos) en diversos géneros y especies, es razonable asumir que este novedoso sistema de control de insectos potencialmente es efectivo en un amplio rango de géneros o incluso familias, esto es, se trata per se de un nuevo tipo de insecticida de biodegradabilidad asegurada, de toxicidad muy baja tanto en humanos como en otros mamíferos y de fácil obtención industrial, máxime en su forma racémica.

El mecanismo de acción deberá ser objeto de investigación en Ciencia básica ya que no se conoce la razón de la mencionada eficacia insecticida, en particular en insectos de reducida actividad muscular en condiciones de ensayo y privación de proteínas durante los ensayos.

En definitiva la presente invención describe:

1. Un método para aumentar la palatabilidad de cebos insecticidas caracterizado porque dichos cebos contienen, además de un insecticida conocido, al menos uno de estos tres compuestos:

- a. cicloserina (tanto D-cicloserina, como L-cicloserina o cualquier mezcla de éstas)
- b. serina (tanto D-serina como L-serina)
- c. floxina B;

así como compuestos del estado de la técnica usuales en cebos.

2. Un cebo que contiene:

- a. agua
- b. al menos algún azúcar o fuente de azúcar incluyendo la miel
- c. al menos un insecticida en concentración efectiva contra la plaga objetivo seleccionado entre insecticida que forman parte del estado de la técnica
- d. Floxina y/o cicloserina y/o serina
- e. En su caso que sea requerido y/o conveniente, emulsionantes, amargantes como benzoato de denatonio, antioxidantes como BHT, colorantes, antimicrobianos,

modificadores de viscosidad de tipo polimérico natural como goma arábica o goma xantana, o de tipo sintético o mineral como aluminosilicatos.

3. Un cebo para matar insectos rastreros incluyendo cucarachas y hormigas caracterizado porque (porcentajes en peso):

- 5 a. el agua se encuentra entre 10 - 99 %
 - b. el insecticida del estado de la técnica se encuentra en una cantidad subletal por debajo de lo que es usual en cebos probadamente efectivos a nivel comercial.
 - c. la floxina se encuentra entre 0.01 - 2 %
 - d. la serina se encuentra entre 0.01 - 2%
 - 10 e. la cicloserina se encuentra entre 0.01 - 2%
 - f. en el caso de cucarachas, la presencia de aumentadores de palatabilidad del tipo cremas de productos vegetales incluyendo crema de cacahuete, ya que hemos observado anecdóticamente que su presencia concurre en un mayor número de visitas a los cebos, aunque aparentemente con una influencia menor que la
 - 15 ocasionada por la serina, cicloserina y/o floxina B.
4. Un método para matar insectos usando D-cicloserina, L-cicloserina o una mezcla de ambos isómeros de cicloserina en cualquier ratio.
5. La invención no se restringe a los siguientes insectos, pero ha sido en ellos donde la invención ha mostrado una eficacia completa medida con sumo detalle: *Lasius niger*,
- 20 *Linepithema humile*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae*, *Musca domestica*, *Simuliidae ssp.*, *Ceratitis capitata*, *Bactrocera oleae*, *Bactrocera cucurbitae*.
6. El uso de L-cicloserina como insecticida de mosquitos excepto en hembras *Aedes aegypti* alimentadas con sangre en cría artificial opcionalmente suplementada con glucosa y/o
- 25 privadas de alimento forzosamente al menos 24 horas antes de ser tratadas con agua, cicloserina, sangre y/o glucosa.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un Producto que comprende al menos uno de los siguientes compuestos

a. cicloserina (tanto D-cicloserina, como L-cicloserina o cualquier mezcla de éstas)

5 b. serina (tanto D-serina como L-serina) y cicloserina (tanto D-cicloserina, como L-cicloserina o cualquier mezcla de éstas)

c. floxina B;

d. Serina (tanto D-serina como L-serina) y floxina B

10 junto con un insecticida conocido y compuestos del estado de la técnica usuales en
cebos como insecticida que aumenta la palatabilidad.

2. Cebo conforme a la reivindicación 1 caracterizado porque dicho cebo contiene:

a. agua

15 b. al menos algún azúcar o fuente de azúcar incluyendo la miel

c. al menos un insecticida en concentración efectiva contra la plaga objetivo seleccionado entre:

20 i. Al-fosfuro, amblyseius, aphelinus, aphidius, aphidoletes, artimisinin, autographa californica NPV, azociclotina, Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis subsp. aizawai, Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki, Bacillus thuringiensis, Beauveria, Beauveria bassiana, betacyfluthrin, biológicos, bisultap, brofluthrin, bromophos-e, bromopropylate, Bt-Corn-GM, Bt-Soya-GM, capsaicin, cartap, celastrus-extract, clorantraniliprol, clorbenzurón, cloretoxifós, clorofluazurón, clorpirifós-e, cnidiadina, criolita, cianofós,
25 ciantraniliprol, ciclaniliprol, cihalotrina, cihexatina, cipermetrina, dacnusa, DCIP, dicloropropeno, dicofol, diglifo, diglifo+dacnusa, dimetacarb, ditioéter, dodecil-acetato, emamectina, encarsia, EPN, eretmocerus, etilendibromuro, eucaliptol, ácidos grasos, ácidos grasos/sales, fenazaquina, fenobucarb (BPMC), fenpiroximato, flubrocitrinato, flufenzina, flupiradifurona, formetanato,
30 formotión, furatiocarb, gamma-cihalotrina, ajo-zumo, granulosis-virus, harmonia, heliothis armigera NPV, inactivo bacteria, ácido indol-3-ilbutírico,

yodometano, hierro, isocarbofós, isofenfos, isofenfos-m, isoprocarb, isotioato,
 caolín, lindano, liuyangmicina, matrina, mefosfolán, metaldehído,
 metarhizium-anisopliae, metamidofós, metolcarb (MTMC), aceite mineral,
 mirex, m-isotiocianato, monosultap, myrothecium verrucaria, naled,
 5 neochrysocharis formosa, nicotina, nicotinoides, aceite, ácido oleico,
 ometoato, orius, oximatrina, paecilomyces, aceite de parafina, paratión-e,
 pasteuria, aceite de petróleo, feromonas, ácido fosforoso, fotorhabdus, foxim,
 fitoseiulus, pirimifos-e, aceite vegetal, plutella xylostella GV, virus de la
 poliedrosis, extractos de polifenoles, oleato de potasio, profenofós, prosuler,
 10 protiofós, piraclofós, piretrinas, piridafentión, pirimidifeno, piriproxifeno,
 extracto de quillay, quinometionato, aceite de colza, rotenona, saponina,
 saponozit, compuestos de sodio, fluosilicato de sodio, almidón, steinernema,
 streptomyces, sulfluramida, azufre, tebupirimfos, temefós, tetradifón,
 tetraniliprol, tiofanox, tiometón, transgénicos, triazamato, trichoderma,
 15 trichogramma, triflumurón, verticillium, vertrina, kappa-bifentrina, kappa-
 teflutrina, dicoromezotiaz, broflanilida, piraziflumida; aldicarb, alanicarb,
 benfuracarb, carbaril, carbofurano, carbosulfán, metiocarb, metomilo, oxamilo,
 pirimicarb, propoxur y tiodicarb; acefato, azinfos-etilo, azinfos-metilo,
 clorfenvinfos, clorpirifos, clorpirifos-metilo, demeton-S-metilo, diazinón,
 20 diclorvos, dicrotofos, dimetoato, disulfotón, etión, fenitrotión, fentión, isoxatión,
 malatión, metamidafos, metidatión, mevinfos, monocrotofos, oximetoato,
 oxidemetón-metilo, paratión, paratión-metilo, fentoato, forato, fosalón, fosmet,
 fosfamidón, pirimifós-metilo, quinalfos, terbufós, tetraclorvinfos, triazofós y
 triclorfón; endosulfán; incluidos etiprol, fipronil, pirafluprol y piriprol;
 25 acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpiram, tiacloprid y
 tiametoxam; espinosad, espinetoram; abamectina, benzoato de emamectina,
 ivermectina, lepimectina y milbemectina; hidropreno, kinopreno, metopreno,
 fenoxicarb y piriproxifeno; pimetrozina, flonicamida y pirifluquinazón;
 clofentezina, hexitiazox y etoxazol; diafentiurón, óxido de fenbutaestán y
 30 propargita; clorfenapir; bensultap, clorhidrato de cartap, tiociclam y tiosultap
 sódico; bistriflurón, diflubenzurón, flufenoxurón, hexaflumurón, lufenurón,
 novalurón y teflubenzurón; buprofezina; ciromazina; metoxifenoazida,
 tebufenoazida, halofenoazida y cromafenoazida; amitraz; piridaben, tebufenpirad,
 tolfenpirad, flufenerim, cienopirafen, ciflumetofen, hidrametilnón, acequinocilo
 35 o fluaciripirim. indoxacarb y metaflumizona; espiroclorfen, espiromesifeno y
 espirotetramat; flubendiamida, los compuestos de ftalamida (R)-3-cloro-N1-{2-

metil-4-[1,2,2,2-tetrafluor-1-(trifluormetil)etil]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfoniletil)ftalamida y (S)-3-cloro-N1-{2-metil-4-[1, 2,2,2-tetrafluor-1-(trifluormetil)etil]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfonil)ftalamida, clorantraniliprol, ciclaniliprol y ciantraniliprol; azadiractina, amidoflumet, bifenazato, fluensulfona, butóxido de piperonilo, piridalilo, sulfoxaflor; piretrinas, piretroides, incluidos acrinatrina, aletrina, bifentrina, ciflutrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, zeta-cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, etofenprox, fenpropatrina, fenvalerato, flucitrinato, tau-fluvalinato, permetrina, silafluofeno, teflutrina y tralometrina.

d. Floxina y/o cicloserina y/o serina con Cicloserina y/o Serina con Floxina B

e. En su caso que sea requerido y/o conveniente, emulsionantes, amargantes como benzoato de denatonio, antioxidantes como BHT, colorantes, antimicrobianos, modificadores de viscosidad de tipo polimérico natural como goma arábica o goma xantana, o de tipo sintético o mineral como aluminosilicatos.

3. Un cebo para matar insectos rastreros incluyendo cucarachas y hormigas caracterizado porque (porcentajes en peso):

- a. el agua se encuentra entre 10 - 99 %
- b. el insecticida del estado de la técnica se encuentra en una cantidad subletal por debajo de lo que es usual en cebos probadamente efectivos a nivel comercial.
- c. la floxina se encuentra entre 0.01 - 2%
- d. la serina se encuentra entre 0.01 -2%
- e. la cicloserina se encuentra entre 0.01 - 2%

y en el caso de cucarachas, la presencia de aumentadores de palatabilidad del tipo cremas de productos vegetales incluyendo crema de cacahuete.

4. Uso de D-cicloserina, L-cicloserina o una mezcla de ambos isómeros de cicloserina en cualquier ratio exceptuando cuando se usa L-cicloserina para matar hembras de *Aedes aegypti* sometidas a privación de sangre y/o glucosa como insecticida.

5. Uso de D-cicloserina, L-cicloserina o una mezcla de ambos isómeros de cicloserina conforme a la reivindicación 4 caracterizado porque los insectos diana

pertenecen a alguno del siguiente grupo: *Lasius niger*, *Linepithema humile*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae*, *Musca domestica*, *Simuliidae ssp.*, *Ceratitis capitata*, *Bactrocera oleae*, *Bactrocera cucurbitae*, como insecticida.

6. Uso de L-cicloserina excepto cuando la L-cicloserina se aplica en hembras *Aedes aegypti* alimentadas con sangre en cría artificial opcionalmente suplementada con glucosa y opcionalmente privadas de alimento durante más de 24 horas como insecticida para matar mosquitos.