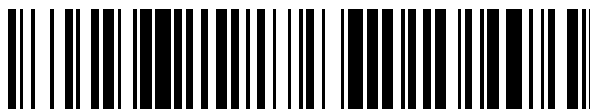


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 699**

51 Int. Cl.:

A01N 25/00 (2006.01)

A01N 43/16 (2006.01)

A01P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2015 PCT/EP2015/063026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2015 E 15727428 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3154341**

54 Título: **Cebo rodenticida que comprende difenacoum y procedimiento de lucha contra roedores blanco dañinos**

30 Prioridad:

13.06.2014 FR 1455437

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.04.2019

73 Titular/es:

**VETAGRO-SUP (100.0%)
1 Avenue Bourgelat
69280 Marcy l'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**CARUEL, HERVÉ;
ESPANA, BERNADETTE;
BESSE, STÉPHANE;
LATTARD, VIRGINIE y
BENOIT, ETIENNE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 710 699 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cebo rodenticida que comprende difenacoum y procedimiento de lucha contra roedores blanco dañinos

La invención se refiere a un cebo rodenticida que comprende difenacoum y a un procedimiento de lucha contra roedores blanco dañinos. La invención se refiere por consiguiente al ámbito técnico de la lucha contra el desarrollo excesivo de poblaciones de roedores blanco dañinos.

Es conocida la utilización de trampas para roedores blanco dañinos que permiten la eliminación de un pequeño número de individuos de una especie de roedor blanco dañino. Se conocen también cebos rodenticidas que hacen las veces de veneno para roedores blanco dañinos.

Se conocen ya cebos rodenticidas y procedimientos que permiten luchar contra roedores dañinos. El difenacoum ha sido utilizado con este fin por ejemplo en el documento EP2090164. Un cebo rodenticida de este tipo comprende por ejemplo difenacoum en una proporción másica de 50 mg por kilogramo (0,005%, 50 ppm) de cebo. En particular, el documento WO 93/01712 describe cebos rodenticidas que comprenden difenacoum en un 0,0025% o un 0,005% (en peso) en forma de granulados conocidos bajo el nombre de "*Klerat pellets*" y acondicionados en un sobrecito de papel e impregnado con benzoato de denatonio a título de agente de amargor.

Tales cebos plantean problemas cuando son puestos a disposición de poblaciones de roedores dañinos y son susceptibles, no obstante, de su composición que proporciona un gusto amargo, de ser consumidos por animales distintos de los roedores dañinos. Pueden por ejemplo ser consumidos por animales domésticos, animales de compañía. Pueden también ser accidentalmente consumidos por seres humanos.

Además, una cantidad importante de difenacoum de estos cebos rodenticidas conocidos puede ser ingerida por animales -particularmente aves- depredadores o carroñeros de roedores dañinos y particularmente de roedores dañinos debilitados que han consumido dicho cebo rodenticida, siendo este consumo susceptible de producir al final la muerte de estos animales depredadores o carroñeros.

La invención trata por consiguiente de paliar estos inconvenientes proponiendo un cebo rodenticida y un procedimiento de lucha contra los roedores blanco dañinos que son eficaces para controlar las poblaciones de roedores dañinos y que permiten sin embargo limitar los riesgos de envenenamiento del hombre y de animales que no son el objetivo.

La invención se refiere en particular a dicho cebo rodenticida y a dicho procedimiento de lucha contra roedores blanco dañinos que permiten limitar los riesgos de envenenamiento de animales depredadores, tales como por ejemplo mamíferos domésticos o salvajes -particularmente zorros- y aves depredadoras o carroñeras de roedores dañinos.

La invención se refiere también a dicho cebo rodenticida y a un procedimiento de lucha contra los roedores blanco dañinos cuya puesta en práctica está de acuerdo con las normas de buen uso particularmente respecto a la protección de las aves, y en particular de las rapaces.

La invención se refiere también a dicho cebo rodenticida y a un procedimiento de lucha contra los roedores blanco dañinos que permiten limitar los riesgos de envenenamiento de animales domésticos y de animales de compañía.

La invención se refiere también en particular a un procedimiento de lucha contra los roedores blanco dañinos que no necesita utilizar dosis masivas de agentes rodenticidas y que es respetuoso con el medio ambiente, la salud humana y los animales que no son el objetivo.

Para ello, la invención se refiere a un cebo rodenticida que comprende:

- difenacoum mayoritariamente en forma de *trans*-difenacoum de fórmula 3-(bifenil-4-il)-1-(4-hidroxycumarin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, en el cual los carbonos 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno tienen la misma configuración absoluta, y;
- un excipiente comestible para roedores blanco dañinos;

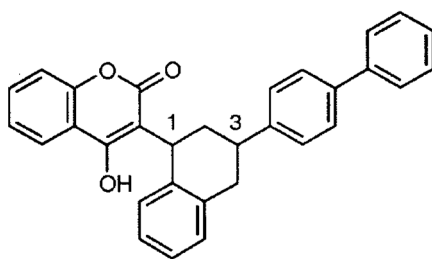
caracterizado por que comprende una proporción de *trans*-difenacoum en el cebo que es superior a una proporción mínima de *trans*-difenacoum letal para hembras adultas de los roedores blanco e inferior a una proporción mínima de *trans*-difenacoum letal para machos adultos de los roedores blanco, siendo la mencionada proporción mínima letal para hembras adultas inferior a la proporción mínima letal para machos adultos.

La invención se refiere por consiguiente a un cebo rodenticida relacionado con una población de roedores blanco dañinos y que comprende *trans*-difenacoum, en el cual la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo es superior a una proporción mínima de *trans*-difenacoum letal para hembras adultas de roedores blanco e inferior a una proporción mínima de *trans*-difenacoum letal para machos adultos de los roedores blanco, siendo la indicada proporción mínima letal para hembras adultas inferior a la proporción mínima letal para machos adultos.

La invención se refiere por consiguiente a dicho cebo rodenticida que comprende difenacoum en forma de un estereoisómero, llamado *trans*-difenacoum, de configuración del difenacoum, siendo el indicado *trans*-difenacoum de fórmula 3-(bifenil-4-il)-1-(4-hidroxicumarin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, siendo los carbonos 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno del *trans*-difenacoum con la misma configuración absoluta, y un excipiente comestible para roedores blanco dañinos.

En todo el texto:

- el término general "difenacoum" designa el 3-(bifenil-4-il)-1-(4-hidroxicumarin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno o la 3-(bifenil-4-il-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil)-4-hidroxicumarina también llamada 2-hidroxi-3-[3-(4-fenilfenil)-1-tetralinil]-4-cromenona en la nomenclatura IUPAC ("International Union of Pure and Applied Chemistry"). El *trans*-difenacoum tiene la fórmula (I) dada a continuación:



(I) ;

en la cual los átomos de carbono "1" y "3" del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno son identificados. En el *trans*-difenacoum el sustituyente (4-hidroxicumarin-3-il) del átomo de carbono 1 por una parte y el sustituyente (bifenil-4-il) del átomo de carbono 3 por otra parte se extienden en "trans" con relación al plano medio de los átomos del grupo 1,2,3,4-tetrahidroftaleno y los átomos de carbono 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno tienen la misma configuración absoluta.

- se designa por "estereoisómeros", a los isómeros de la misma fórmula semi-desarrollada, pero cuya posición relativa de los átomos difiere en el espacio. Se designa por "estereoisómeros de configuración" los estereoisómeros cuya conversión de uno a otro de los estereoisómeros necesita una ruptura/reformación de un enlace covalente interatómico. Así, se designa por "estereoisómeros de configuración" los estereoisómeros que no son isómeros de conformación (o "rotámeros", cuya conversión de uno en otro de los isómeros de conformación va acompañada únicamente de una rotación de una parte de la molécula según el eje de un enlace σ formado por el recubrimiento axial de orbitales). Un mismo estereoisómero de configuración puede estar formado por uno u otro de los eventuales diferentes enantiómeros de este estereoisómero de configuración o de una mezcla, racémica o no, de estos eventuales enantiómeros;
- las configuraciones absolutas de los átomos de carbono 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno están determinadas según la nomenclatura de Cahn, Ingold y Prelog;
- se entiende por "proporción mínima letal" de *trans*-difenacoum en un cebo, la proporción -particularmente la proporción másica- más baja de *trans*-difenacoum en el indicado cebo susceptible de matar al menos un individuo de la población de roedores blanco dañinos por consumo de dicho cebo. La proporción másica mínima letal de *trans*-difenacoum de un cebo es por consiguiente la proporción (en gramos de *trans*-difenacoum por gramo de cebo) que permite matar al menos un individuo de la población de roedores blanco dañinos por consumo de dicho cebo por este individuo de la población de roedores blanco dañinos.

Se determina la proporción de *trans*-difenacoum mínima letal para las hembras adultas de la población de roedores blanco midiendo el porcentaje de mortalidad de las hembras adultas en lotes de roedores blanco dañinos que consumen los cebos durante un tiempo predeterminado, ofreciéndose los cebos en cada uno de los lotes en cantidad suficiente para satisfacer el apetito de los roedores blanco y que comprenden una proporción predeterminada de *trans*-difenacoum. La proporción de *trans*-difenacoum mínima letal para hembras adultas es la proporción de *trans*-difenacoum de los cebos puestos a disposición e ingeridos por el lote de roedores blanco y que presenta el porcentaje más bajo no nulo de mortalidad por hemorragia en las hembras.

De forma similar, se determina la proporción de *trans*-difenacoum letal para machos adultos de la población de roedores blanco midiendo el porcentaje de mortalidad de los machos adultos en lotes de roedores blanco dañinos que consumen cebos durante un tiempo predeterminado, siendo los cebos puestos a disposición de cada uno de los lotes en cantidad suficiente para satisfacer el apetito de los machos adultos de los roedores blanco y que comprenden una proporción predeterminada de *trans*-difenacoum. La proporción de *trans*-difenacoum es calificada de no letal para los machos adultos si los cebos propuestos para el lote de roedores blanco no producen ninguna mortalidad por hemorragia en los roedores blanco machos adultos.

Ventajosamente y según la invención, el excipiente comestible comprende al menos un alimento seleccionado entre el grupo formado por granos de cereales -particularmente granos de cereal pelados-, molturaciones de granos de cereal, harinas de granos de cereal, copos de granos de cereal, salvado de cereales, granos no cerealeros -por

ejemplo, granos de alfalfa-, molturaciones de granos no cerealeros, harinas de granos no cerealeros, copos de granos no cerealeros, salvado de plantas no cerealeras. El excipiente comestible puede comprender cualquier alimento susceptible de ser consumido por los roedores blanco dañinos.

5 Ventajosamente y según la invención, el excipiente comestible es seleccionado para poder ser consumido por roedores blanco dañinos. La invención se refiere por consiguiente a un cebo rodenticida que comprende una composición que comprende mayoritariamente *trans*-difenacoum en el difenacoum y un excipiente comestible apto para estimular a los roedores blanco dañinos para consumir el indicado cebo.

10 Ventajosamente y según la invención, el excipiente comestible no es letal para roedores blanco dañinos. En particular el excipiente comestible no es rodenticida en sí mismo y está exento de compuestos rodenticidas. Ventajosamente y según la invención, el excipiente comestible es seleccionado para estimular el consumo del cebo por roedores blanco dañinos y para permitir el consumo del cebo por roedores blanco dañinos.

15 Ventajosamente, el excipiente comestible comprende al menos un alimento seleccionado entre el grupo formado por alimentos de origen vegetal y alimentos de origen animal. Ventajosamente, el alimento es seleccionado entre el grupo formado por granos de uno o de varios cereales, de granos pelados de uno o de varios cereales, de molturaciones de uno o de varios cereales, de copos de uno o de varios cereales, de salvado de uno o de varios cereales y de harinas de uno o de varios cereales. A título de ejemplo, se selecciona el alimento entre el grupo formado por avena, trigo, cebada, maíz, soja y arroz.

20 Ventajosamente, el excipiente comestible comprende al menos un alimento azucarado. Por ejemplo, puede tratarse de un alimento que comprenda al menos un azúcar seleccionado entre el grupo formado por sacarosa, lactosa, fructosa y glucosa. Puede tratarse de un jarabe de azúcar -por ejemplo, de un jarabe de azúcar obtenido por hidrólisis del almidón- o de un jarabe de azúcar obtenido por hidrólisis de sacarosa (jarabe de azúcar invertido), o de un jarabe de azúcar de remolacha, o de un jarabe de arce, o de un jarabe de caña de azúcar, o de un jarabe obtenido a partir de una planta del género *Stevia*.

25 Ventajosamente, el excipiente comestible comprende al menos un alimento de estimulación del apetito de los roedores blanco dañinos seleccionado entre el grupo formado por copos y harina de albumen de nuez de coco (copra).

Ventajosamente, el excipiente comestible comprende al menos un alimento de estimulación del apetito de los roedores blanco dañinos seleccionado entre el grupo formado por nueces, avellanas, y almendras -ralladas y/o en polvo.

30 Ventajosamente, el excipiente comestible comprende al menos una materia grasa seleccionada entre el grupo formado por grasas vegetales, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de colza, grasa de soja, aceite de girasol, manteca de cacao, aceite de cacahuete, manteca de cacahuete, aceite de maíz, aceite de palma), grasas animales y aceites animales (mantequilla, manteca de cerdo, aceite de pescado).

35 Ventajosamente, el excipiente comestible comprende al menos un alimento seleccionado entre el grupo formado por proteínas animales. A título de ejemplo, se puede citar por ejemplo la leche en polvo -particularmente la leche descremada en polvo-, los huevos -particularmente los huevos en polvo- y los hidrolizados de proteínas animales.

40 Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida se presenta en forma sólida. Ventajosamente, el cebo rodenticida según la invención puede encontrarse en forma de bolitas, granulados, de bloque o de una pasta susceptibles de ser consumidos por los roedores blanco dañinos o de un material sólido susceptible de ser roído por los roedores blanco dañinos. Ventajosamente, el cebo rodenticida sólido según la invención puede presentarse en forma de un bloque rígido, de un bloque semirrígido o de un gel.

Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida puede presentarse en forma de un polvo. En particular, dicho cebo rodenticida en forma de polvo está adaptado para poder ensuciar la piel del(de los) roedor(es) blanco dañino(s) y para poder ser ingerido por éste(estos) cuando se asean.

45 Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida puede también presentarse en forma líquida. El cebo rodenticida es entonces una bebida.

Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida comprende al menos un colorante. Un colorante de este tipo permite en particular proporcionar al indicado cebo un color fácilmente detectable e identificable por un usuario de dicho cebo rodenticida.

50 Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida comprende al menos un conservante apto para asegurar su conservación durante su almacenado.

Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida comprende al menos un agente de amargor -particularmente una cantidad de benzoato de denatonio-.

Ventajosamente, en una variante según la invención, el cebo rodenticida comprende exclusivamente difenacoum a título de sustancia rodenticida. En particular, el cebo rodenticida según la invención está exento de cualquier otra sustancia anticoagulante para uso rodenticida.

5 Sin embargo, en otra variante según la invención, el cebo rodenticida puede comprender otra sustancia rodenticida distinta del difenacoum y/o cualquier otra sustancia anti-daño tal como una sustancia insecticida y/o acaricida.

Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida comprende una proporción másica de *trans*-difenacoum comprendida entre 1 ppm y 30 ppm -particularmente comprendida entre 5 ppm y 25 ppm, de preferencia entre 5 ppm y 15 ppm. El cebo rodenticida según la invención es por consiguiente un cebo rodenticida débilmente dosificado en *trans*-difenacoum a título de sustancia inhibidora del complejo 1 de la vitamina K epóxido reductasa (VKORC1, "Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1"). Se expresa la proporción (en ppm) de *trans*-difenacoum en el cebo por la cantidad -particularmente en masa- de *trans*-difenacoum relacionada con la cantidad -particularmente una masa- de cebo.

15 Ventajosamente y según la invención, cuando los roedores blanco dañinos son seleccionados entre el grupo formado por mamíferos roedores omnívoros de la familia de los *Muridae*, la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo rodenticida es una proporción másica comprendida entre 4 ppm y 12 ppm.

Ventajosamente y según la invención, el difenacoum se encuentra mayoritariamente en forma de *trans*-difenacoum. Ventajosamente, el *trans*-difenacoum es mayoritario en el difenacoum. La expresión según la cual el *trans*-difenacoum es mayoritario en el difenacoum, significa que la cantidad (másica, molar o volúmica) del *trans*-difenacoum es mayoritaria -superior al 50%- en la totalidad del difenacoum presente en el cebo (bajo todas sus formas estereoisómeras de configuración) según la invención.

25 Ventajosamente y según la invención, el cebo rodenticida comprende mayoritariamente *trans*-difenacoum en el difenacoum, siendo el *trans*-difenacoum el estereoisómero de configuración del difenacoum -llamado homoeostereoisómero del difenacoum- en el cual los dos carbonos 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno tienen la misma configuración absoluta. El cebo comprende una cantidad mayoritaria de *trans*-difenacoum con relación a la cantidad total de difenacoum. El cebo comprende mayoritariamente *trans*-difenacoum con relación al conjunto de los estereoisómeros de configuración -*trans*-difenacoum y *cis*-difenacoum- del difenacoum. El cebo comprende difenacoum mayoritariamente en forma de *trans*-difenacoum.

En un cebo según la invención:

30 - la cantidad de *trans*-difenacoum relacionada con la suma de las cantidades de cada uno de los estereoisómeros (i) de configuración (*trans*-difenacoum y *cis*-difenacoum) del difenacoum es superior al 0,5 (50%):

$$\frac{\text{Cantidad de trans-difenacoum}}{\sum i [\text{Cantidad de estereoisómero (i) del difenacoum}]} > 0,5 (50\%)$$

35 - la concentración de *trans*-difenacoum relacionada con la suma de las concentraciones de cada uno de los estereoisómeros (i) de configuración (*trans*-difenacoum y *cis*-difenacoum) del difenacoum es superior al 0,5 (50%):

$$\frac{[\text{trans-difenacoum}]}{\sum i [\text{estereoisómero (i) del difenacoum}]} > 0,5 (50\%)$$

- la proporción ($p_{\text{trans-difenacoum}}$) de *trans*-difenacoum es superior a la proporción ($p_{\text{cis-difenacoum}}$) de *cis*-difenacoum. En un cebo según la invención, la proporción de *trans*-difenacoum es de más del 50% con relación al difenacoum total.

40 Los inventores han observado que el *trans*-difenacoum y el *cis*-difenacoum no presentan la misma remanencia hepática en roedores blanco dañinos y que el *trans*-difenacoum es de hecho el estereoisómero de configuración del difenacoum que es de más baja remanencia hepática en los roedores blanco, particularmente en los roedores blanco dañinos. Han observado que el *trans*-difenacoum de un cebo, cuando es ingerido por un roedor blanco dañino, desaparece del hígado del roedor blanco dañino que ha consumido dicho cebo según la invención más rápidamente que el *cis*-difenacoum. El roedor blanco dañino muerto o vivo que ha ingerido el mencionado cebo es menos peligroso con respecto a los mamíferos no roedores y aves que consumen el roedor blanco dañino y en particular respecto a los depredadores (de mamíferos no roedores y de aves) que consumen preferentemente las vísceras de sus presas y en particular su hígado.

50 Los inventores han observado además que dicho cebo según la invención que comprende mayoritariamente *trans*-difenacoum de menor remanencia hepática en roedores blanco dañinos permite de hecho luchar eficazmente contra roedores blanco dañinos.

Ventajosamente y según la invención, el *trans*-difenacoum está presente en el cebo con una cantidad superior al 50% -particularmente superior al 70%, de preferencia comprendida entre un 80% y un 100%, más preferentemente comprendida entre un 90% y un 99%- con relación a la cantidad total de difenacoum. Ventajosamente, el *trans*-

difenacoum está presente en el cebo con una cantidad comprendida entre un 92% y un 98% con relación a la cantidad total de difenacoum. Nada impide sin embargo que el *trans*-difenacoum esté presente en el cebo en cantidad sustancialmente del orden del 100% con relación a la cantidad total de difenacoum.

Ventajosamente, el cebo puede comprender otro estereoisómero, llamado *cis*-difenacoum, de configuración del difenacoum en el cual los átomos de carbono 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno del difenacoum son configuraciones absolutas distintas. Ventajosamente, el indicado *cis*-difenacoum está presente en el cebo con una cantidad inferior al 50% -particularmente inferior al 30%, preferentemente comprendida entre un 0% y un 20%, en particular inferior al 10%, más preferentemente del orden del 5%- con relación a la cantidad total de difenacoum. Ventajosamente, el cebo puede estar exento de *cis*-difenacoum. Ventajosamente, el *cis*-difenacoum, está presente en el cebo en una proporción no letal para los roedores blanco. Ventajosamente, el *cis*-difenacoum y el *trans*-difenacoum están presentes en el cebo con una relación molar *cis*-difenacoum/*trans*-difenacoum comprendida en el intervalo [0; 1/19] (0 excluido, 1/19 incluido).

La invención se refiere también a un procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos por diseminación de un cebo susceptible de ser ingerido por los roedores blanco dañinos y que comprende *trans*-difenacoum, caracterizado por que el cebo comprende un excipiente comestible para roedores blanco dañinos y una proporción de *trans*-difenacoum en el cebo que es superior a una proporción mínima letal para hembras adultas de los roedores blanco e inferior a una proporción mínima letal para machos adultos de los roedores blanco, siendo la indicada proporción mínima letal para hembras adultas inferior a la proporción mínima letal para machos adultos, y por que se diseminan estos cebos en una cantidad suficiente para ser letal para las hembras adultas de los roedores blanco.

La invención se refiere por consiguiente a un procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos por diseminación de un cebo susceptible de ser ingerido por los roedores blanco dañinos, comprendiendo el indicado cebo:

- difenacoum en forma de *trans*-difenacoum de fórmula 3-(bifenil-4-il)-1-(4-hidroxycumarin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, en el cual los átomos de carbono 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno tienen la misma configuración absoluta, y;
- un excipiente comestible para roedores blanco dañinos;

caracterizado por que el cebo comprende una proporción de *trans*-difenacoum en el cebo que es superior a una proporción mínima letal para hembras adultas de los roedores blanco e inferior a una proporción mínima letal para machos adultos de los roedores blanco, siendo la indicada proporción mínima letal para las hembras adultas inferior a la proporción mínima letal para machos adultos, y por que se diseminan estos cebos en una cantidad suficiente para ser letal para las hembras adultas de los roedores blanco.

La invención se refiere por consiguiente a un procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos de este tipo por diseminación de un cebo susceptible de ser ingerido por los roedores blanco dañinos, en el cual el cebo comprende:

- difenacoum en forma de un estereoisómero, llamado *trans*-difenacoum, de configuración del difenacoum, siendo el indicado *trans*-difenacoum de fórmula 3-(bifenil-4-il)-1-(4-hidroxycumarin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, siendo los átomos de carbono 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno del *trans*-difenacoum de la misma configuración absoluta, y
- un excipiente comestible para roedores blanco dañinos.

En un procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos según la invención, se pone a disposición de los roedores blanco dañinos una cantidad de cebo susceptible de ser ingerida por los roedores blanco dañinos, siendo la indicada cantidad de cebo suficiente para matar las hembras de roedores blanco dañinos, comprendiendo el indicado cebo *trans*-difenacoum en una proporción que es superior a una proporción mínima letal para las hembras adultas de los roedores blanco e inferior a una proporción mínima letal para machos adultos de los roedores blanco.

En un procedimiento de lucha selectiva según la invención, se adapta la proporción *trans*-difenacoum en el cebo y la cantidad de cebo diseminado con el fin de matar -en particular como consecuencia del consumo durante varios días de al menos una parte del cebo por las hembras- las hembras de la población de roedores, sin buscar matar los machos de la población de roedores.

En un procedimiento de lucha selectiva según la invención, se disemina una cantidad de cebos -particularmente una cantidad de cebos más débilmente dosificados en *trans*-difenacoum que los cebos conocidos que comprenden difenacoum y que son por consiguiente menos tóxicos para el medio ambiente y para los animales que no son blanco susceptibles de consumir solo ocasionalmente y accidentalmente el cebo. En un procedimiento según la invención, se disemina dicho cebo que es menos tóxico para animales que no son blanco (por ejemplo, los depredadores de los roedores blanco) susceptibles de consumir roedores - muerto o vivos - blanco que han ingerido una cantidad de dicho cebo. El procedimiento según la invención sigue siendo sin embargo eficaz para

luchar contra el desarrollo de las poblaciones de roedores blanco dañinos tratando selectivamente las hembras de los roedores blanco dañinos.

Los inventores han observado, de forma totalmente sorprendente e imprevisible que la remanencia hepática del difenacoum en las hembras adultas de roedores blanco dañinos que han consumido dicho cebo comprenden *trans*-difencoum- en particular un cebo débilmente dosificado en *trans*-difencoum- es superior a la remanencia hepática del difenacoum en los machos adultos. Las hembras adultas de roedores blanco dañinos presentan un tiempo de coagulación aumentado en comparación con el tiempo de coagulación de los machos adultos y son más sensibles que los machos adultos a cebos que comprenden el *trans*-difencoum- en particular con cebos débilmente dosificados en *trans*-difencoum-. También han observado que es posible controlar la población de roedores blanco dañinos sin utilizar dosis de difenacoum que son tóxicas para el medio ambiente y los animales no-blanco tratando selectivamente las hembras adultas lo cual limita el número de camadas de roedores blanco dañinos.

Un procedimiento de lucha selectiva según la invención:

- permite un envenenamiento preferencial -particularmente un envenenamiento selectivo- de las hembras adultas de roedores blanco dañinos;
- permite limitar la cantidad de difenacoum en el cuerpo -particularmente en el hígado- de los roedores blanco dañinos envenenados (vivos o muertos);
- permite limitar la cantidad de difenacoum susceptible de ser ingerido por un ser humano o por un animal no blanco en un consumo accidental de cebo,
- permite limitar la cantidad de difenacoum susceptible de ser ingerido por un depredador -particularmente por un ave en general y en particular por una rapaz- o por un carroñero que ha consumido un cadáver de roedor blanco dañino previamente envenenado mediante tales cebos.

Un procedimiento de lucha selectiva según la invención permite por consiguiente considerar selectivamente los roedores blanco dañinos hembras limitando el crecimiento de la población de roedores blanco dañinos limitando los riesgos de envenenamiento de un ser humano o de animales que no son blanco o de depredadores y/o carroñeros de los roedores blanco dañinos.

Ventajosamente y según la invención, la proporción de *trans*-difencoum en el cebo y la cantidad de cebo diseminado se adaptan para lograr:

- en las hembras adultas de los roedores blanco dañinos, una cantidad de *trans*-difencoum letal para las indicadas hembras adultas, y;
- en los machos adultos de los roedores blanco dañinos una cantidad de *trans*-difencoum no letal para los indicados machos adultos.

En una primera variante de un procedimiento de lucha selectiva según la invención, se selecciona la proporción de *trans*-difencoum en el cebo en combinación con la cantidad de cebo diseminado de forma que las hembras adultas de los roedores blanco consuman en el transcurso de un periodo de tiempo único de 24 horas consecutivas una cantidad de cebo suficiente para que sea letal para las indicadas hembras adultas de los roedores blanco que consuman dicho cebo.

Ventajosamente en esta variante, se disemina una cantidad de cebo suficiente para que sea letal para las hembras de roedores blanco dañinos que consuman dicho cebo durante un único periodo de tiempo de 24 horas consecutivas, pero sin buscar matar los machos de la población de roedores. Ventajosamente, en esta variante de un procedimiento de lucha selectiva contra los roedores blanco dañinos según la invención, se disemina un cebo mortal en una sola toma o cebo "*one-shot*" en inglés.

Ventajosamente y según esta variante de la invención, un consumo único de cebo por hembras de roedores blanco dañinos es suficiente para producir la muerte de hembras de roedores blanco dañinos.

En una segunda variante de un procedimiento de lucha selectiva según la invención, se selecciona la proporción de *trans*-difencoum en el cebo en combinación con la cantidad de cebo diseminado de forma que las hembras adultas de roedores blanco dañinos consuman una cantidad de difenacoum que sea;

- no letal para las hembras adultas de roedores blanco dañinos que consuman dicho cebo durante un periodo de tiempo de 24 horas consecutivas, y;
- suficiente para ser letal para las hembras adultas de roedores blanco dañinos que consuman dicho cebo durante varios periodos de tiempo de 24 horas consecutivas, siendo los indicados periodos de tiempo sucesivos.

En esta segunda variante de un procedimiento de lucha selectiva según la invención, se disemina una cantidad de cebos suficiente para que sea letal para las hembras de roedores blanco dañinos al ingerir los indicados cebos durante al menos dos días consecutivos pero que sea insuficiente para provocar la muerte de roedores blanco dañinos y de animales que no son blanco por ingestión accidental de una ración única de los indicados cebos.

En esta segunda variante de un procedimiento de lucha selectiva según la invención, la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo es seleccionada para poder llegar en las hembras de los roedores blanco dañinos que hayan consumido dicho cebo durante al menos dos días consecutivos a una cantidad mínima de *trans*-difenacoum letal para las indicadas hembras adultas y para llegar en los machos adultos de los roedores blanco dañinos que hayan consumido dicho cebo durante al menos dos días consecutivos una cantidad de *trans*-difenacoum no letal para los indicados machos adultos.

Ventajosamente y según la invención, la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo y la cantidad de cebo diseminado son seleccionadas para permitir a la(s) hembra(s) adulta(s) ingerir una dosis diaria másica de *trans*-difenacoum comprendida entre 0,2 y 10 mg -preferentemente entre 0,2 y 2 mg- de *trans*-difenacoum por kilogramo de hembra adulta.

Ventajosamente y según la invención, la cantidad de *trans*-difenacoum letal para la(s) hembra(s) adulta(s) es alcanzada después de la ingestión de una pluralidad de dosis diarias de dicho cebo por la(s) hembra(s) adulta(s). En un procedimiento según la invención, se eliminan progresivamente las hembras de los roedores blanco dañinos después de varias ingestiones sucesivas de dosis diarias de cebo débilmente dosificado con *trans*-difenacoum.

Ventajosamente y según la invención, la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo y la cantidad de cebo diseminado son seleccionadas para poder alcanzar en el hígado de las hembras adultas, al día siguiente (D+4) del tercer día (D+3) de un periodo de tiempo de tres días consecutivos (D+1, D+2 y D+3), comprendiendo cada día del indicado periodo de tiempo al menos una ingestión de cebo, una cantidad de *trans*-difenacoum inferior o igual a 10 µg -particularmente comprendida entre 3 µg y 8 µg- de *trans*-difenacoum por gramo de hígado de las indicadas hembras adultas.

Ventajosamente y según la invención, la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo y la cantidad de cebo diseminado son seleccionadas para poder alcanzar en el hígado de las hembras adultas, al día siguiente de una tercera ingestión de tres tomas diarias sucesivas, una cantidad de *trans*-difenacoum inferior o igual a 10 µg de *trans*-difenacoum por gramo de hígado de las indicadas hembras adultas.

El periodo de tiempo de tres días consecutivos durante el cual un roedor blanco dañino ingiere el cebo puede empezar a contar a partir de una primera ingestión de cebo por un roedor blanco dañino. La misma puede también comenzar a contar desde el inicio de la diseminación del cebo.

Ventajosamente y según la invención, la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo está adaptada para poder alcanzar en el hígado de los machos adultos, al día siguiente (D+4) del tercer día (D+3) de un periodo de tiempo de tres días consecutivos (D+1, D+2 y D+3), comprendiendo cada día del indicado periodo de tiempo al menos una ingestión de cebo, una cantidad de *trans*-difenacoum inferior o igual a 3 µg de *trans*-difenacoum por gramo de hígado de los machos adultos.

Ventajosamente y según la invención, las tres ingestiones diarias sucesivas de cebo por las hembras adultas a razón de 0,2 a 10 mg de *trans*-difenacoum por ingestión y por kilogramos de hembra adulta -preferentemente de 0,2 a 2 mg- se adaptan para ser letales para las hembras adultas de 4 a 8 días a contar desde la primera de las tres ingestiones.

Ventajosamente y según la invención, en un procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos, se utiliza un cebo según la invención.

Un primer aspecto independiente de un cebo y de un procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos según la invención se refiere a un procedimiento de lucha contra una población de roedores blanco dañinos por diseminación de cebos susceptibles de ser ingeridos por los roedores blanco dañinos y que comprende difenacoum en el cual el *trans*-difenacoum, que es el estereoisómero de configuración del difenacoum que es el menos remanente en el hígado de los roedores blanco dañinos, es mayoritario en el difenacoum.

Ventajosamente según este primer aspecto, se disemina una cantidad de cebo rodenticida, es decir de un cebo que comprende una proporción mayoritaria de *trans*-difenacoum, siendo la indicada cantidad de cebo suficiente para ser rodenticida. Se disemina por consiguiente una cantidad de cebo comprendiendo mayoritariamente *trans*-difenacoum que presenta en los roedores blanco dañinos una remanencia hepática más baja que un cebo que comprende mayoritariamente *cis*-difenacoum, pero una eficacia rodenticida mantenida. El procedimiento según este primer aspecto permite por consiguiente limitar el envenenamiento secundario de mamíferos no roedores y de aves susceptibles de alimentarse con roedores muertos o vivos envenenados, pero comprendiendo una cantidad rodenticida de difenacoum. El procedimiento según este primer aspecto permite también limitar dicho envenenamiento secundario de mamíferos no roedores y de aves susceptibles de consumir preferentemente las vísceras -en particular el hígado- de los indicados roedores muertos o vivos envenenados.

Ventajosamente según este primer aspecto, es posible que el cebo comprenda *cis*-difenacoum, pero en una proporción no letal para los roedores blanco.

Ventajosamente, según este primer aspecto, la relación molar del *cis*-difenacoum y del *trans*-difenacoum en el cebo está comprendida en el intervalo [0; 1/19] (0 excluido, 1/19 incluido).

Un segundo aspecto independiente de un cebo y de un procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos según la invención se refiere a un procedimiento de lucha contra los roedores blanco dañinos en el cual:

- se selecciona un cebo que comprende difenacoum, y
- se disemina una cantidad de este cebo en combinación con una proporción de difenacoum en el cebo con el fin de que los roedores blanco dañinos consuman una cantidad de difenacoum que es:
 - o no letal para los roedores blanco dañinos que consuman dicho cebo durante un periodo de tiempo de 24 horas consecutivas, y;
 - o suficiente para ser letal para roedores blanco dañinos que consuman dicho cebo durante varios periodos de tiempo de 24 horas consecutivas, siendo los indicados periodos de tiempo sucesivos.

Este segundo aspecto se refiere por consiguiente en particular a un procedimiento de lucha contra los roedores blanco dañinos en el cual se disemina una cantidad de cebo letal para roedores blanco dañinos que consumen de forma duradera este cebo y no letal para roedores o animales que no son blanco que consumen accidentalmente este cebo. Se habla entonces de procedimiento de lucha contra roedores blanco dañinos en el cual se utiliza un cebo "multidosis" o, en inglés "*multi-feeding*". En un procedimiento según este segundo aspecto, un consumo de cebo por un roedor blanco dañino durante un periodo de tiempo de 24 horas es insuficiente para producir la muerte de dicho roedor, mientras que un consumo repetido de cebos durante al menos dos días consecutivos permite producir la muerte del roedor blanco dañino. En particular, según este segundo otro aspecto, un único consumo de cebo es suficiente para producir la muerte de un roedor blanco dañino, mientras que un consumo repetido de cebo durante al menos dos días consecutivos permite producir la muerte del roedor blanco dañino.

Ventajosamente según este segundo aspecto, el difenacoum se encuentra en una proporción másica inferior a las 200 ppm en el cebo, es decir inferior a 200 mg de difenacoum por kilogramo de cebo. Ventajosamente, la proporción másica de difenacoum está comprendida entre 1 ppm y 30 ppm. La misma puede particularmente estar comprendida entre las 10 ppm y 100 ppm (10 mg a 100 mg de difenacoum por kilogramo de cebo), particularmente comprendida entre 10 ppm y 50 ppm (10 mg a 50 mg de difenacoum por kilogramo de cebo). Ventajosamente, la proporción másica de difenacoum está comprendida entre 5 ppm y 25 ppm, de preferencia comprendida entre 5 ppm y 15 ppm, más preferentemente del orden de 15 ppm (15 mg de difenacoum por kilogramo de cebo). La proporción másica de difenacoum en el cebo representa la masa de difenacoum en relación con la masa de cebo que comprende el difenacoum.

La invención se refiere igualmente a un cebo rodenticida, a un procedimiento de lucha y a un procedimiento de lucha selectiva contra roedores blanco dañinos, caracterizados en combinación por la totalidad o parte de las características mencionadas anteriormente o a continuación.

Otros fines, características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción siguiente y de los ejemplos dados a título únicamente no limitativo y que se refieren a las figuras adjuntas, en las cuales:

- la figura 1 es un espectro de RMN del protón del *trans*-difenacoum;
- la figura 2 es un espectro de RMN del protón del *cis*-difenacoum;
- la figura 3 es una representación gráfica comparativa de la remanencia hepática del *trans*-difenacoum y del *cis*-difenacoum en la rata;
- la figura 4 es una representación gráfica de la remanencia hepática (en µg/g de hígado) al D₄ y del tiempo de Quick (TQ) de ratas macho que han recibido en tratamiento tres dosis (D₁, D₂ y D₃) de una solución que comprende *trans*-difenacoum administrado a razón de 0,6; 1,2 o 2,6 mg de difenacoum por kilogramo de rata;
- la figura 5 es una representación gráfica de la remanencia hepática (en µg/g de hígado) al D₄ y del tiempo de Quick de ratas hembras que han recibido en tratamiento tres dosis (D₁, D₂ y D₃) de una solución que comprende *trans*-difenacoum administrado a razón de 0,3; 0,6; 0,75; 1,2 o 2,6 mg de difenacoum por kilogramo de rata.

Un cebo rodenticida según la invención comprende *trans*-difenacoum a título de agente rodenticida y al menos una sustancia atractiva para roedores blanco dañinos, siendo la indicada sustancia atractiva apta para estimular el apetito de especies de roedores blanco dañinos y la ingestión de dicho cebo por los roedores blanco dañinos.

Se obtiene *trans*-difenacoum por cualquier método que permita la separación de los estereoisómeros de configuración *cis/trans* del difenacoum. Por ejemplo, se conoce por el documento EP 0 175 466 un procedimiento de separación de los estereoisómeros de configuraciones *trans* y *cis* del difenacoum por precipitación selectiva del estereoisómero de configuración *cis* de una solución de los estereoisómeros de configuración en un alcohol tal como el etanol.

También es posible separar los estereoisómeros de configuración *trans*-difenacoum y *cis*-difenacoum por cromatografía, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y formar una mezcla enriquecida

en *trans*-difenacoum o una composición de *trans*-definacoum sustancialmente exenta de *cis*-difenacoum. Se realiza dicho enriquecimiento mediante HPLC, por ejemplo, en una columna C8 (250 mm x 10 mm) mantenida a la temperatura de 30°C. La fase móvil está formada por un 80% de acetonitrilo y por un 20% de agua ácida. El caudal de la fase móvil se mantiene en 2 mL/min. Se detecta el *trans*-difenacoum y el *cis*-difenacoum por análisis espectrofotométrico a la longitud de onda de 258 nm.

En particular, una separación de este tipo de los estereoisómeros de configuración *trans*-difenacoum y *cis*-difenacoum se describe por ejemplo en la publicación "Kelly M.J. et al., (1993), *Journal of Chromatography*, 620, 105-112. Simple and rapid method for the determination of the diastereoisomers of difenacoum in blood and liver using high performance liquid chromatography with fluorescence detection". Este documento describe también que los estereoisómeros de configuración *cis* y *trans* del difenacoum se distinguen en RMN del protón (espectrómetro Bruker AC 300 a 300,13 MHz en CDCl₃), siendo la señal correspondiente al protón del átomo de carbono 1 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno del *trans*-difenacoum un triplete centrado en 4,76 ppm y que presenta una constante de acoplamiento de 4,20 Hz y siendo la señal del protón del átomo de carbono 1 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno del *cis*-difenacoum un cuádruplete centrado en 4,9 ppm y que presenta constante de acoplamiento de 11,9 y 6 Hz con los protones del átomo de carbono 2 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno.

También es posible realizar un enriquecimiento en *trans*-difenacoum por cromatografía HPLC en columna de fase inversa INERTSIL® ODS2 de una longitud de 150 mm y 4,6 mm de diámetro interno. La fase estacionaria inversa presenta una granulometría de 5 µm, una porosidad de 80Å y una superficie específica de 500 m²/g. La fase móvil está constituida por una mezcla de acetonitrilo (62%), de isopropanol (3%) y de acetato de amonio (35%) ajustado a un pH de 4 con ácido acético. El caudal de la fase móvil es de 1,5 mL/min y la detección se realiza por espectrofotometría a 260 nm. Se detecta y se recoge un estereoisómero de configuración "*trans*" cuyo tiempo de retención es del orden de 5,74 min y otro estereoisómero de configuración "*cis*" cuyo tiempo de retención es del orden de 4,87 min.

La separación de los estereoisómeros de configuración "*trans*" y "*cis*" del difenacoum puede también ser realizada por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC, Waters) en una cadena Acquity Waters que comprende una columna Acquity UPLC BEH C18 con granulometría de 1,7 µm y dimensiones 2,1 x 50 mm a 35°C. La fase móvil está formada por un gradiente de una solución acuosa de ácido trifluoracético (TFA, 0,1%) y por una solución de TFA 0,1% en acetonitrilo. El caudal de la fase móvil es de 0,6 mL/min. El tiempo de retención del estereoisómero de configuración "*trans*" es de 8,2 min y el del estereoisómero de configuración el menos retenido ("*cis*") es del orden de 7,3 min.

La separación de los estereoisómeros de configuración "*trans*" y "*cis*" del difenacoum puede también ser realizada por cromatografía líquida a alta presión (HPCL) en una columna XBridge C18 (dimensiones 4,6 x 150 mm y granulometría de 5 µm) y con una fase móvil formada al 45% de una solución acuosa de TFA al 0,1% y 55% de una solución de TFA al 0,1% en acetonitrilo. El caudal de la fase móvil es de 1,2 mL/min. El tiempo de retención del estereoisómero de configuración el más retenido ("*trans*") es de 23,7 y el del estereoisómero de configuración el menos retenido ("*cis*") es del orden de 21,0 min.

El espectro RMN del protón del estereoisómero de configuración "*trans*" del difenacoum está representado en la figura 1 y el espectro RMN del protón del estereoisómero de configuración "*cis*" del difenacoum está representado en la figura 2. El espectro RMN del protón del *trans*-difenacoum presenta un triplete (4,5399 ppm, 4,5644 ppm y 4,5876 ppm) característico del protón llevado por el átomo de carbono 1 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno. En comparación, el espectro RMN del protón del *cis*-difenacoum presenta un cuádruplete (4,8180 ppm, 4,8374 ppm, 4,8550 ppm y 4,8721 ppm) característico del protón llevado por el carbono 1 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno.

Remanencia hepática comparada de los estereoisómeros de configuración "*trans*" y "*cis*" del difenacoum en la rata

En el D0, se realizó un cebado por vía oral en ratas de laboratorio (ratas Sprague Dawley, Charles River, Sain Germain sur l'Arbresle, Francia) macho, de 8 semanas de edad y de masa corporal del orden de los 200 g con una mezcla que comprende un 56% de *trans*-difenacoum y un 44% de *cis*-difenacoum a razón de 5,2 mg de difenacoum por kilogramo de rata. Se mantuvieron las ratas con vida mediante inyección subcutánea diaria de una solución de vitamina K a razón de 1 U por rata. En el D+1, D+3, D+5, D+7, D+10, D+14 y D+21, se anestesiaron 4 ratas mediante isoflurano y luego se sacrificaron, los hígados se extractaron y congelaron hasta análisis. Los contenidos hepáticos medios del *trans*-difenacoum y del *cis*-difenacoum se analizaron mediante HPLC y se facilitan en la tabla 1 dada a continuación.

Tabla 1

Contenido hepático, µg/g	D+1	D+3	D+5	D+10	D+21
<i>trans</i>	4,22	1,05	0,25	0,1	0,17
<i>cis</i>	16,82	8,28	4,86	1,85	1,41

Desde el D+1, el contenido medio de *trans*-difenacoum en el hígado de ratas es más bajo que el contenido medio de *cis*-difenacoum en los hígados de rata cebados con sustancialmente la misma cantidad de cada estereoisómero de configuración del difenacoum. El *trans*-difenacoum presenta una remanencia hepática significativamente más baja que el *cis*-difenacoum.

- 5 Se dispersa por cualquier método conocido en sí mismo por el experto en la materia una cantidad de *trans*-difenacoum en una cantidad de una sustancia atractiva y nutritiva de los roedores blanco dañinos. Se seleccionan las cantidades de *trans*-difenacoum y de sustancia atractiva con el fin de formar un cebo rodenticida según la invención que comprende *trans*-difenacoum en una proporción superior a la proporción mínima letal en menos de 10 días para las hembras adultas de los roedores blanco dañinos y no letal para los machos adultos de los roedores blanco dañinos.

Una proporción de *trans*-difenacoum de este tipo en el cebo rodenticida es adaptada para que los roedores blanco dañinos hembras que consumen el cebo rodenticida, la sustancia atractiva y el *trans*-difenacoum, ingieran una cantidad de *trans*-difenacoum que es suficiente para la obtención del efecto rodenticida y el control de la población de roedores blanco dañinos.

- 15 1) Comparación de la eficacia rodenticida del *trans*-difenacoum y del *cis*-difenacoum en la rata macho y la rata hembra

El estudio comparativo de la eficacia rodenticida del *trans*-difenacoum purificado y del *cis*-difenacoum purificado se realizó mediante la administración por medio de una sonda gástrica (por vía oral):

- 20 - de una solución de *cis*-difenacoum a un primer lote de cuatro ratas "Sprague Dawley" machos de masa comprendida entre 180 y 220 g, y
- de una solución de *trans*-difenacoum a un segundo lote de cuatro ratas "Sprague Dawley" machos de masa comprendida entre 180 y 220 g.

Estas soluciones de *cis*-difenacoum y de *trans*-difenacoum se obtuvieron por peso de *cis*-difenacoum o de *trans*-difenacoum y dilución en una mezcla formada por un 95% de aceite vegetal y por un 5% de DMSO.

- 25 Las dosis de *cis*-difenacoum y de *trans*-difenacoum utilizadas son de 2,6 mg de *cis*-difenacoum o de *trans*-difenacoum por kilogramo de rata. La dosis de 2,6 mg de *cis*-difenacoum y de *trans*-difenacoum por kilogramo de rata corresponde a 4 veces la semi-dosis letal (DL₅₀) del difenacoum para las ratas. La dosis de 5,2 mg de *cis*-difenacoum o de *trans*-difenacoum por kilogramo de rata corresponde a 8 veces la semi-dosis letal (DL₅₀) del difenacoum para las ratas.

- 30 Se extrajeron 3 mL de sangre de las ratas anestesiadas con isoflurano, en tubos de extracción comprendiendo citrato (3,2%). Se centrifugaron los tubos en 2000 g durante 10 minutos y se recuperó la fracción plasmática.

Se analizó el tiempo de coagulación (tiempo de Quick) del plasma por medio del kit "Neoplastine CI Determination of Prothrombin Time" (Diagnostica Stago, Asnières, Francia) por medición en un Thrombotimer option 2 plus (Behnk Elektronik, Norderstedt, Alemania).

- 35 El valor normal del tiempo de coagulación de ratas no tratadas es de 10 a 20 segundos.

La administración (D₀) por vía oral de *cis*-difenacoum a razón de 2,6 mg de *cis*-difenacoum por kilogramo de rata o de *trans*-difenacoum a esta misma posología de 2,6 mg/kg de rata provoca un aumento importante del tiempo de coagulación de las ratas en 1 día después de la administración (D₊₁).

- 40 El tiempo de coagulación (D₊₁) de la sangre de ratas tratadas con una posología de 2,6 mg de *cis*-difenacoum o de *trans*-difenacoum por kilogramo de rata es de 62 segundos. Por el contrario, la administración por vía oral de *trans*-difenacoum a esta misma posología (2,6 mg/kg) o a una posología doble (5,2 mg/kg) provoca desde luego un aumento del tiempo de coagulación (62 s y 84 s) en el D₊₁ pero conduce a un valor de tiempo de Quick en el D₊₃ que es bajo (10 a 20 s) y del orden de magnitud del tiempo de Quick de un control no tratado. Ninguna indicación fue por consiguiente dada a los inventores para seleccionar un cebo rodenticida que comprendiese mayoritariamente *trans*-difenacoum.

Además, el valor de la constante de inhibición (K_i_{cis} = 60 nM) de la enzima recombinante rVKORC1 por el *cis*-difenacoum es similar al valor de la constante de inhibición de la rVKORC1 por el *trans*-difenacoum (K_i_{trans} = 30 nM).

- 2) Remanencia hepática del *cis*-difenacoum y del *trans*-difenacoum en la rata macho

- 50 En el D₀, se administraron por vía oral a siete lotes de cuatro ratas de laboratorio (ratas Sprague Dawley, Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, Francia) machos de masa comprendida entre 180 y 220 g, una composición control del estado de la técnica comprendiendo una proporción molar de *cis*-difenacoum del 56 % y una proporción molar de *trans*-difenacoum del 44 % a razón de 5,2 mg de difenacoum por kilogramo de rata. En los D₊₁, D₊₃, D₊₅, D₊₇, D₊₁₀, D₊₁₄, y D₊₂₁ se sacrificaron 4 ratas. Se extrajeron y se pesaron los hígados extraídos. Se realizó una extracción líquido/sólido del difenacoum mediante acetona. Se analizó el difenacoum mediante HPLC en columna

C8 (250 mm x 10 mm) mantenida a 30°C con una fase móvil formada por el 80% de acetonitrilo y el 20% de agua ácida. El caudal de la fase móvil se mantuvo en 2 mL/min y se detectó el *trans*-difenacoum y el *cis*-difenacoum por análisis espectrofotométrico a la longitud de onda de 258 nm. Se cuantificó el *trans*-difenacoum y el *cis*-difenacoum por contrastado con cantidades conocidas de *trans*-difenacoum y de *cis*-difenacoum. Los resultados se facilitan en la figura 3 en la cual la remanencia hepática del *trans*-difenacoum se representa mediante cuadrados llenos (■) y la remanencia hepática del *cis*-difenacoum se representa mediante rombos abiertos (◇). Mientras la proporción molar del *trans*-difenacoum administrado a las ratas es del 46 %, la concentración hepática (expresada en µg de difenacoum por g de hígado) de *trans*-difenacoum en el D₊₁ solo es del orden de 1 µg/g, siendo el *trans*-difenacoum casi indetectable desde el D₊₃, subsistiendo solo el *cis*-difenacoum (4 µg/g).

3) Remanencia hepática del *trans*-difenacoum y del *cis*-difenacoum en la rata macho y en la rata hembra.

Se realizó un estudio comparable al descrito en el punto 2) y en el cual se realizó una separación y un dosificado del *trans*-difenacoum y del *cis*-difenacoum en los D₊₁, D₊₃, D₊₅, D₊₇, D₊₁₀, D₊₁₄ y D₊₂₁ en las ratas macho y en las ratas hembra tratadas. En el D₊₁, la concentración de *cis*-difenacoum en el hígado de las ratas hembra (9,6 µg/g de hígado) es sustancialmente equivalente a la concentración de *cis*-difenacoum en el hígado de las ratas macho (7,3 µg/g de hígado). La concentración en el D₊₁ de *trans*-difenacoum en el hígado de las ratas hembra (3,3 µg/g de hígado) es superior a la concentración de *trans*-difenacoum en el hígado de las ratas macho (0,9 µg/g de hígado). Además, en el D₊₃, el valor de la concentración de *trans*-difenacoum en el hígado es superior en las ratas hembra en comparación con las ratas macho. La cinética de eliminación hepática del *trans*-difenacoum es más lenta en las ratas hembra que en las ratas macho en particular durante los 3 primeros días. Así para una misma posología, las concentraciones hepáticas en *trans*-difenacoum son más importantes en la hembra al menos hasta tres días después del tratamiento (D₀).

4) Administración de *trans*-difenacoum a ratas macho. Tratamiento multidosis ("multi-feeding")

A contar desde el D₀, y durante tres días (D₀, D₊₁ y D₊₂) se administraron diariamente a ratas macho "Sprague Dawley" machos de masa comprendida entre 180 y 220 g, *trans*-difenacoum a razón de 0,6 mg/kg, 1,2 mg/kg o 2,6 mg/kg (mg de *trans*-difenacoum por kilogramo de rata macho). En el D₊₃, se midió el tiempo de coagulación de estas ratas macho y se dosificó la concentración del *trans*-difenacoum en el hígado de estas ratas macho (expresado en µg de *trans*-difenacoum por g de hígado). Los resultados se facilitan en la figura 4. La administración durante tres días (D₀, D₊₁ y D₊₂) a razón de una dosis de *trans*-difenacoum por día a ratas macho permitió un aumento masivo del tiempo de Quick de estas ratas en el D₊₃, y un valor de remanencia hepática moderado del orden de 2 µg/g de hígado.

Con una posología de 1,2 mg/kg o superior (correspondiente a un cebo dosificado entre 12 ppm y 25 ppm de *trans*-difenacoum), el aumento del tiempo de Quick es tal que la sangre de la rata macho es incoagulable. La probabilidad de que esta rata macho muera de hemorragia es por consiguiente máxima.

5) Administración de *trans*-difenacoum a ratas hembra. Tratamiento multi-dosis ("multi-feeding").

A contar del D₀ y durante tres días (D₀, D₊₁ y D₊₂), se administraron a ratas "Sprague Dawley" hembras a razón de una dosis por día, *trans*-difenacoum a razón de 0,3 mg/kg; 0,6 mg/kg; 0,75 mg/kg; 1,2 mg/kg o 2,6 mg/kg (mg de *trans*-difenacoum por kilogramo de rata hembra). En el D₊₄, se midió el tiempo de coagulación de estas ratas hembra y se dosificó la concentración de *trans*-difenacoum en el hígado (expresada en µg de difenacoum por g de hígado) de estas ratas hembra. Los resultados se facilitan en la figura 5. La administración durante tres días (D₀, D₊₁ y D₊₂) a razón de una dosis de *trans*-difenacoum superior a 0,3 mg/kg/día a ratas hembra permitió alcanzar en el día D₊₄ un valor elevado del tiempo de coagulación (superior o igual a 500 segundos) en estas ratas hembra y una remanencia hepática moderada e inferior a 10 µg de *trans*-difenacoum por gramo de hígado para una dosis inferior a 2,6 mg/kg.

Con una posología de 0,6 mg/kg o superior (correspondiente a un cebo rodenticida dosificado entre 6 ppm y 25 ppm de *trans*-difenacoum), el aumento del tiempo de coagulación es tal que la sangre de las ratas hembra es incoagulable. La probabilidad de que estas ratas hembra mueran de hemorragia es por consiguiente máxima.

Un cebo rodenticida que comprenda mayoritariamente *trans*-difenacoum y un procedimiento de lucha contra roedores dañinos blanco utilizando dicho cebo rodenticida según la invención permiten la obtención de un efecto anticoagulante en administración repetida (multidosis) de *trans*-difenacoum y concentraciones hepáticas muy bajas en las ratas macho, con una posología de 3 veces 2,6 mg/kg y en las ratas hembra con una posología inferior a 2,6 mg/kg.

La concentración hepática en *trans*-difenacoum es del orden de 2 µg/g de hígado de rata macho al día siguiente de la última toma de cebo rodenticida. Considerando que la masa de un hígado de rata es del orden de 10 g, la cantidad global de *trans*-difenacoum es de 20 µg por hígado y si se considera que el hígado incluye la mitad del *trans*-difenacoum ingerido por el roedor, un cadáver de rata contendría aproximadamente 40 µg de *trans*-difenacoum. En consecuencia, los cadáveres de ratas muertas por ingestión de un cebo según la invención presentan un riesgo eco-toxicológico disminuido con relación a los cadáveres de ratas muertas por ingestión de un cebo del estado de la técnica.

A título de ejemplo la concentración hepática en *trans*-difenacoum de ratas hembra tratadas con un cebo que permite la administración 2,6 mg de *trans*-difenacoum por día y por kilogramo de rata durante 3 días es del orden de 12 µg/g de hígado. Ya que los depredadores de roedores eliminan rápidamente el *trans*-difenacoum, un cadáver de roedor blanco dañino hembra que incluye dicha dosis de *trans*-difenacoum es mucho menos peligroso para el medio ambiente que un cadáver de roedor blanco dañino hembra conteniendo la misma cantidad de estereoisómero de configuración *cis*-difenacoum.

Así, el uso del *trans*-difenacoum en un cebo en el cual el *trans*-difenacoum es mayoritario es menos peligroso para las especies expuestas al riesgo de intoxicación primaria (ingestión del cebo según la invención por un animal que no es blanco -por un perro, por ejemplo-). El consumo de un cebo según la invención conteniendo mayoritariamente *trans*-difenacoum no es susceptible de plantear problemas a un animal que no es blanco si el mencionado animal que no es blanco puede tener acceso a cantidades importantes de dicho cebo rodenticida y de forma repetida en el tiempo. El riesgo se reduce por consiguiente de forma considerable con relación a la utilización de la mezcla comercial que es susceptible de provocar una intoxicación mortal en el perro en una sola toma.

- 6) Tratamiento de una población de ratas con un cebo según la invención comprendiendo 50 ppm de *trans*-difenacoum

Se realizaron cebos rodenticidas por dispersión de una cantidad de difenacoum en una pasta a base de harina y de materia grasa vegetal y de forma que el cebo contenga 50 mg de difenacoum por kilogramo de cebo (50 ppm de difenacoum).

Se realizó:

- un cebo rodenticida según la invención comprendiendo mayoritariamente *trans*-difenacoum (91 % de *trans*-difenacoum y 9% de *cis*-difenacoum), y
- a título comparativo cebos que comprenden:
 - o 4% de *trans*-difenacoum y 96 % de *cis*-difenacoum, y;
 - o 38 % de *trans*-difenacoum y 62% de *cis*-difenacoum.

Roedores (10 ratas Sprague Dawley (SD), de los cuales 5 machos y 5 hembras) se colocaron en jaulas individuales. Durante 4 días (D1, D2, D3 y D4), cada rata fue aprovisionada con una cantidad de cebo suficiente para satisfacer su apetito. Al término de estos 4 días, una alimentación exenta de cebo fue administrada. Se midió, por peso el consumo diario de cada cebo. A la muerte del animal, el hígado del animal muerto se extirpó, se congeló y se conservó hasta el análisis del contenido hepático en estereoisómeros de configuración del difenacoum.

El consumo diario medio de cebo por las ratas y el periodo de tiempo en el que sobrevino la muerte de los animales y la mortalidad se facilitan en la tabla 2 dada a continuación.

Tabla 2

<i>Trans</i> -difenacoum / <i>Cis</i> -difenacoum	Masa media de cebo diariamente consumida, g/día	Sobrevino la muerte	Mortalidad, %
91/9	12,9	D4 a D8	90
38/62	12,5	D4 a D9	90
4/96	11,8	D5 a D9	100

El cebo según la invención (91,9) fue consumido por las ratas con la misma cantidad media diaria que los cebos (2/98 o 18/82) no enriquecidos con *trans*-difenacoum. El periodo de tiempo en el que sobrevino la muerte de los animales que han consumido el cebo según la invención fue más corto (D4-D8) que el periodo de tiempo en el que sobrevino la muerte de los animales que consumieron los cebos 38/62 (D4 a D9) y 4/96 (D5 a D9).

Los resultados de dosificados hepáticos del *trans*-difenacoum y del *cis*-difenacoum se han presentado en la Tabla 3 dada a continuación en la cual "*trans*-difenacoum/*cis*-difenacoum" representa la cantidad (molar o másica) de *trans*-difenacoum relacionada con la cantidad (molar o másica) de *cis*-difenacoum en el cebo puesto a disposición de las ratas y el término "Residuo" representa el porcentaje de difenacoum (*trans*-difenacoum y *cis*-difenacoum) detectada en el hígado de las ratas y relacionada con la cantidad media total de difenacoum ingerida por cada rata.

Tabla 3

<i>Trans</i> -difenacoum / <i>Cis</i> -difenacoum	Contenido hepático, µg/g		Residuo, %
	<i>Trans</i> -difenacoum	<i>Cis</i> -difenacoum	
91/9	0,76	0,63	0,4
38/62	0,15	1,54	0,59
4/96	0,01	2,16	0,7

El contenido medio en difenacoum en el hígado de las ratas macho es de 8,4 µg (4,3 µg de *trans*-difenacoum y 4,1 µg de *cis*-difenacoum), 13,5 µg (1,4 µg de *trans*-difenacoum y 12,1 µg de *cis*-difenacoum) y 21,9 µg (0,2 µg de *trans*-difenacoum y 21,7 µg de *cis*-difenacoum por rata macho tratada respectivamente con los cebos (91/9), (38/62) y (4/96). Los residuos de difenacoum en el hígado de las ratas macho se minimizaron con la utilización del cebo según la invención.

El contenido medio en difenacoum en el hígado de las ratas hembra es de 14,9 µg (8,5 µg de *trans*-difenacoum y 6,4 µg de *cis*-difenacoum), 16,4 µg (1,1 µg de *trans*-difenacoum y 15,2 µg de *cis*-difenacoum) y 10,8 µg (10,7 µg de *cis*-difenacoum) por rata hembra tratada con respectivamente los cebos (91/9), (38/62) y 4/96). Los residuos de difenacoum en el hígado de las ratas hembra se minimizaron con la utilización del cebo según la invención. Los residuos de difenacoum en el hígado de las ratas macho se minimizaron también con relación a los residuos de difenacoum en el hígado de las ratas hembra con la utilización del cebo (91/9) según la invención.

Un cebo (91/9) que comprende mayoritariamente *trans*-difenacoum permite por consiguiente limitar los residuos de difenacoum en el hígado de roedores y su toxicidad secundaria frente a los depredadores de los roedores o de carroñeros de cadáveres de roedores.

- 7) Tratamiento de una población de ratas con un cebo según la invención comprendiendo 15 ppm de *trans*-difenacoum

Se realizaron cebos rodenticidas por dispersión de una cantidad de difenacoum en una pasta a base de harina y de materia grasa vegetal y de forma que el cebo contenga 15 mg de difenacoum por kilogramo de cebo (15 ppm de difenacoum).

Se realizó:

- un cebo rodenticida según la invención comprendiendo mayoritariamente *trans*-difenacoum (sustancialmente 100% de *trans*-difenacoum), y
- a título de comparación un cebo que comprende un 100% de *cis*-difenacoum.

Roedores (10 ratas Sprague Dawley (SD), de las cuales 5 machos y 5 hembras) se colocaron en jaulas individuales y se trataron como se ha descrito en el punto 6) indicado más arriba. El consumo diario medio de cebo por las ratas y el periodo de tiempo en el que sobrevino la muerte de los animales y la mortalidad se indican en la tabla 4 dada a continuación.

Tabla 4

<i>Trans</i> -difenacoum / <i>Cis</i> -difenacoum	Masa media de cebo diariamente consumida, g/día	Sobrevino la muerte	Mortalidad, %
100/0	14,8	D5 a D8	70%
0/100	13,8	D4 a D9	100%

El cebo comprendiendo 15 ppm de difenacoum según la invención (sustancialmente del orden del 100 % de *trans*-difenacoum en el difenacoum) fue consumido por ratas con la misma cantidad media diaria que el cebo (100 % *cis*-difenacoum). El periodo de tiempo en el que sobrevino la muerte de los animales que consumieron el cebo según la invención es comparable (D5-D8) al periodo de tiempo en el que sobrevino la muerte de los animales que consumieron el cebo débilmente dosificado con *trans*-difenacoum (D4 a D9).

Un cebo según la invención que comprende mayoritariamente *trans*-difenacoum permite por consiguiente limitar los residuos de difenacoum en el hígado de roedores y su toxicidad secundaria con respecto a los depredadores de los roedores o de carroñeros de cadáveres de roedores manteniendo una eficacia rodenticida del orden del 70% con un cebo débilmente dosificado con 15 ppm.

REIVINDICACIONES

1. Cebo rodenticida que comprende:

- difenacoum mayoritariamente en forma de *trans*-difenacoum de fórmula 3-(bifenil-4-il)-1-(4-hidroxycumarin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, en el cual los átomos de carbono 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno del *trans*-difenacoum tienen la misma configuración absoluta, y;
- un excipiente comestible para roedores blanco dañinos;

caracterizado por que comprende una proporción de *trans*-difenacoum en el cebo que es superior a una proporción mínima de *trans*-difenacoum letal para hembras adultas de los roedores blanco e inferior a una proporción mínima de *trans*-difenacoum letal para machos adultos de los roedores blanco, siendo la mencionada proporción mínima letal para hembras adultas inferior a la proporción mínima letal para machos adultos.

2. Cebo según la reivindicación 1, caracterizado por que el excipiente comestible comprende al menos un alimento seleccionado entre el grupo formado por granos de cereales, molturaciones de granos de cereal, harinas de granos de cereal, copos de granos de cereal, salvado de cereales, granos no cerealeros, molturaciones de granos no cerealeros, harinas de granos no cerealeros, copos de granos no cerealeros, salvado de plantas no cerealeras.

3. Cebo según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que presenta una proporción másica de *trans*-difenacoum comprendida entre 1 ppm y 30 ppm.

4. Procedimiento de lucha selectiva contra una población de roedores blanco dañinos por diseminación de un cebo susceptible de ser ingerido por los roedores blanco dañinos, comprendiendo el indicado cebo:

- difenacoum mayoritariamente en forma de *trans*-difenacoum de fórmula 3-(bifenil-4-il)-1-(4-hidroxycumarin-3-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, en el cual los átomos de carbono 1 y 3 del grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno del *trans*-difenacoum tienen la misma configuración absoluta, y;
- un excipiente comestible para roedores blanco dañinos;

caracterizado por que el cebo comprende una proporción de *trans*-difenacoum en el cebo que es superior a una proporción mínima letal para hembras adultas de roedores blanco e inferior a una proporción mínima letal para machos adultos de roedores blanco, siendo la indicada proporción mínima letal para hembras adultas inferior a la proporción mínima letal para machos adultos, y por que se diseminan estos cebos en una cantidad suficiente para ser letal para hembras adultas de roedores blanco.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo y la cantidad de cebo diseminado se adaptan para lograr:

- en las hembras adultas de los roedores blanco dañinos, una cantidad de *trans*-difenacoum letal para las indicadas hembras adultas, y;
- en los machos adultos de los roedores blanco dañinos una cantidad de *trans*-difenacoum no letal para los indicados machos adultos.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por que se selecciona la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo en combinación con la cantidad de cebo diseminado de forma que las hembras adultas de los roedores blanco consuman en el transcurso de un periodo de tiempo único de 24 horas consecutivas una cantidad de cebo suficiente para que sea letal para las indicadas hembras adultas de los roedores blanco que consuman dicho cebo.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por que se selecciona la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo en combinación con la cantidad de cebo diseminado de forma que las hembras adultas de roedores blanco dañinos consuman una cantidad de difenacoum que es:

- no letal para las hembras adultas de roedores blanco dañinos que consuman dicho cebo durante un periodo de tiempo de 24 horas consecutivas, y;

- suficiente para ser letal para las hembras adultas de roedores blanco dañinos que consuman dicho cebo durante varios periodos de tiempo de 24 horas consecutivas, siendo los indicados periodos de tiempo sucesivos.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que la cantidad de *trans*-difenacoum letal para la(s) hembra(s) adulta(s) es alcanzada después de la ingestión de una pluralidad de dosis diarias de dicho cebo por la(s) hembra(s) adulta(s).

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 8, caracterizado por que la proporción de *trans*-difenacoum en el cebo y la cantidad de cebo diseminado son seleccionados para poder llegar al hígado de las hembras adultas, al día siguiente del tercer día de un periodo de tiempo de tres días consecutivos, comprendiendo cada día del mencionado periodo de tiempo al menos una ingestión de cebo, una cantidad de *trans*-difenacoum inferior o igual a 10 µg de *trans*-difenacoum por gramo de hígado de las indicadas hembras adultas.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 9, caracterizado por que se selecciona para permitir un envenenamiento preferencial de las hembras adultas de roedores blanco dañinos.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 10, caracterizado por que se utiliza un cebo según una de las reivindicaciones 1 a 3.

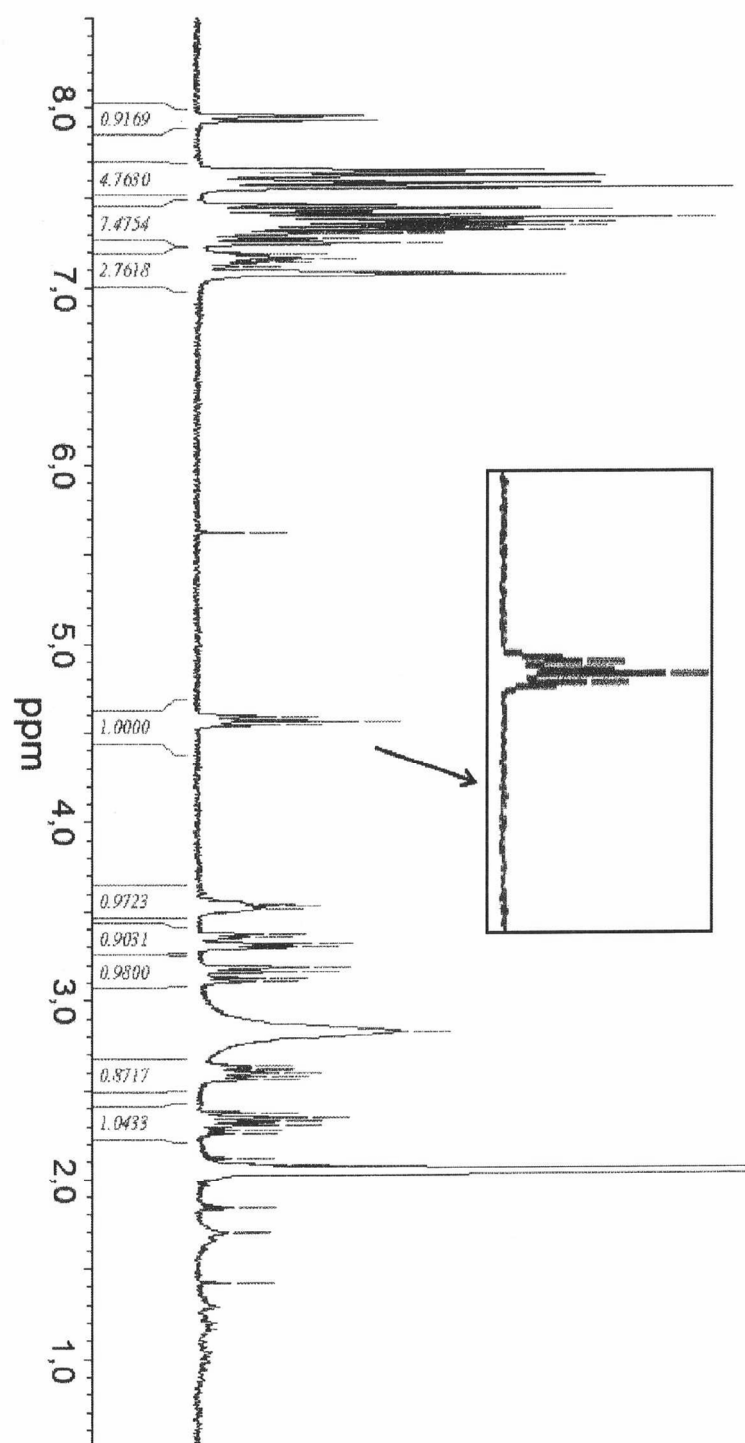


Fig 1

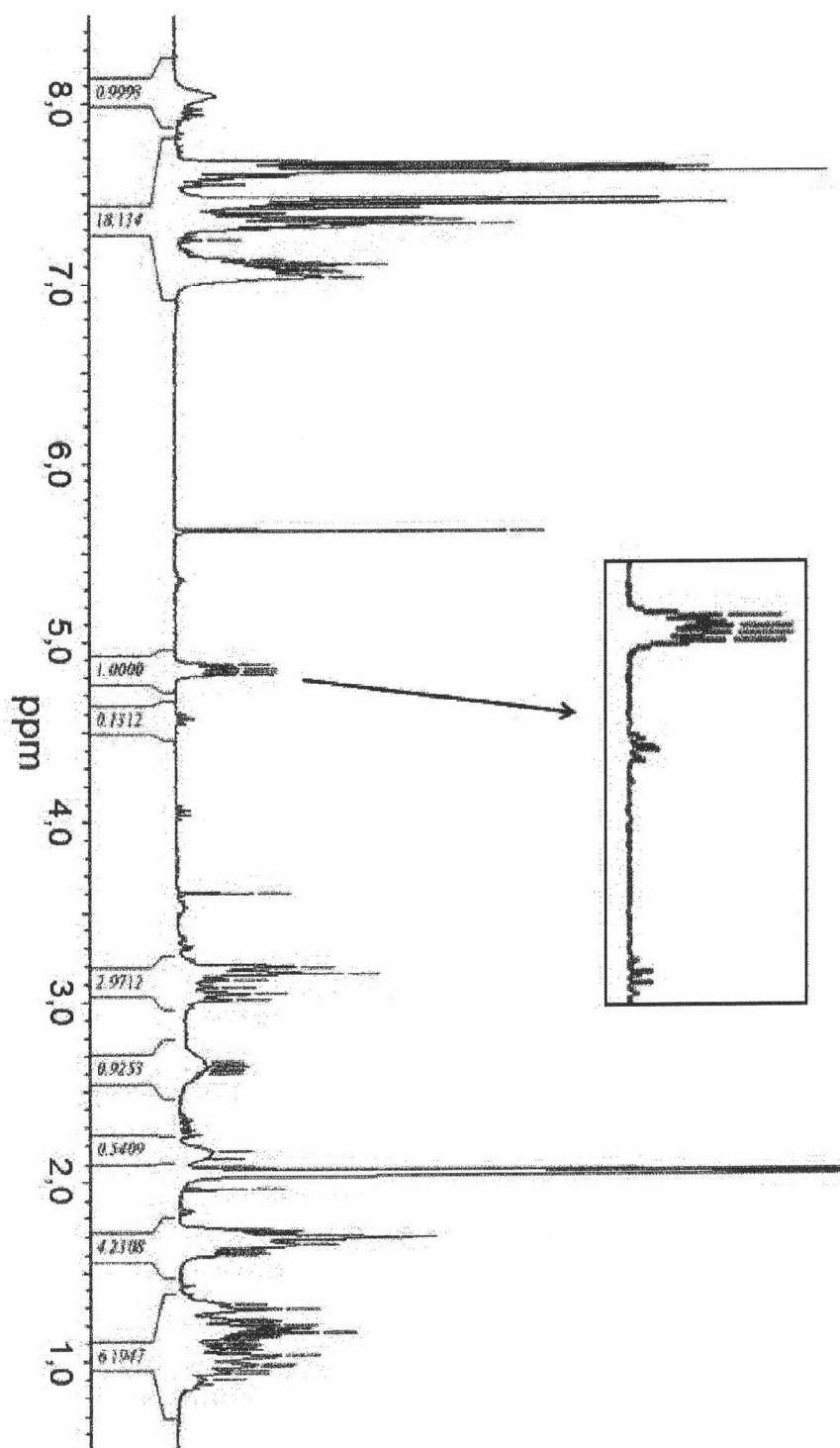


Fig 2

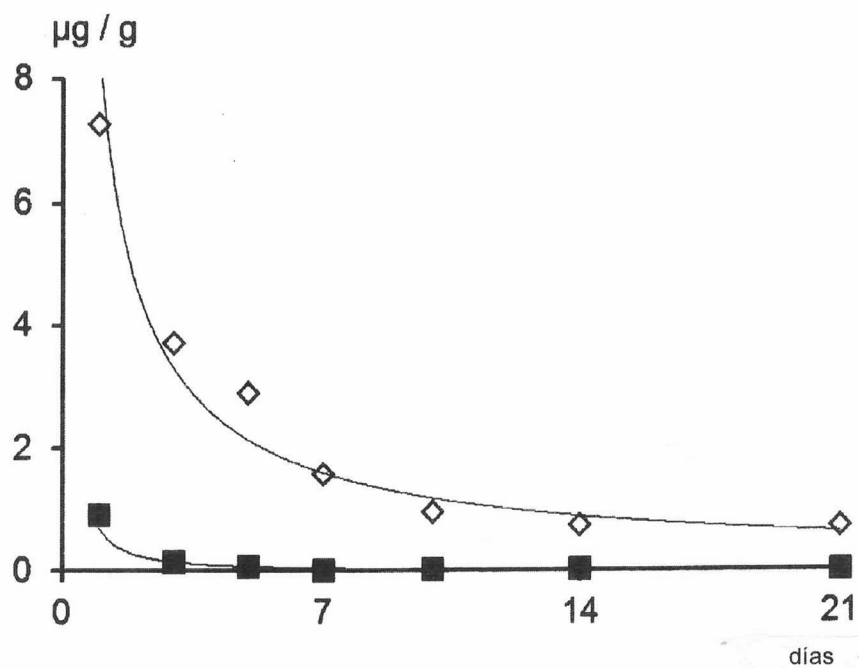


Fig 3

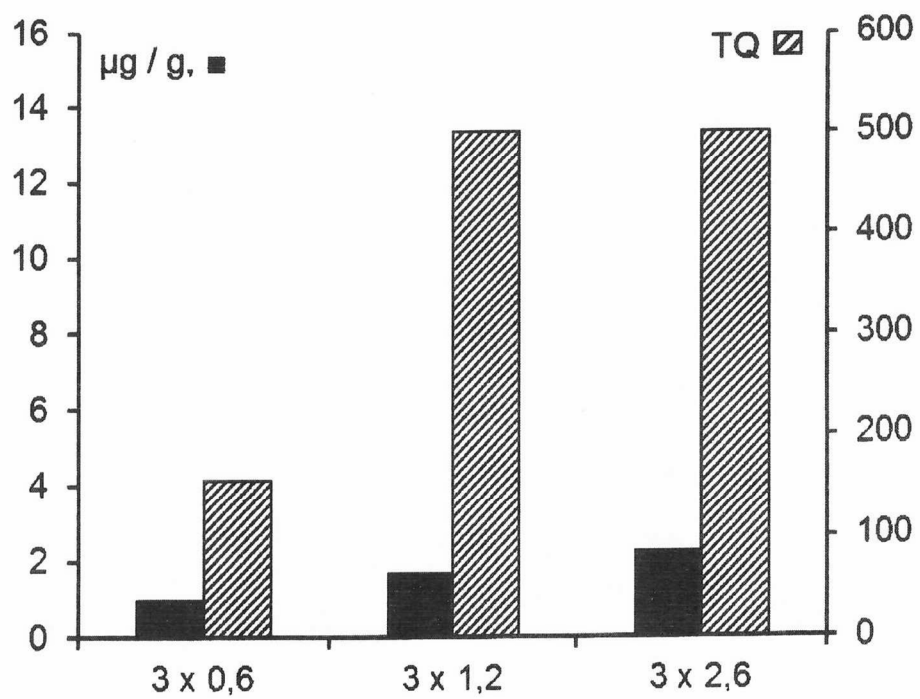


Fig 4

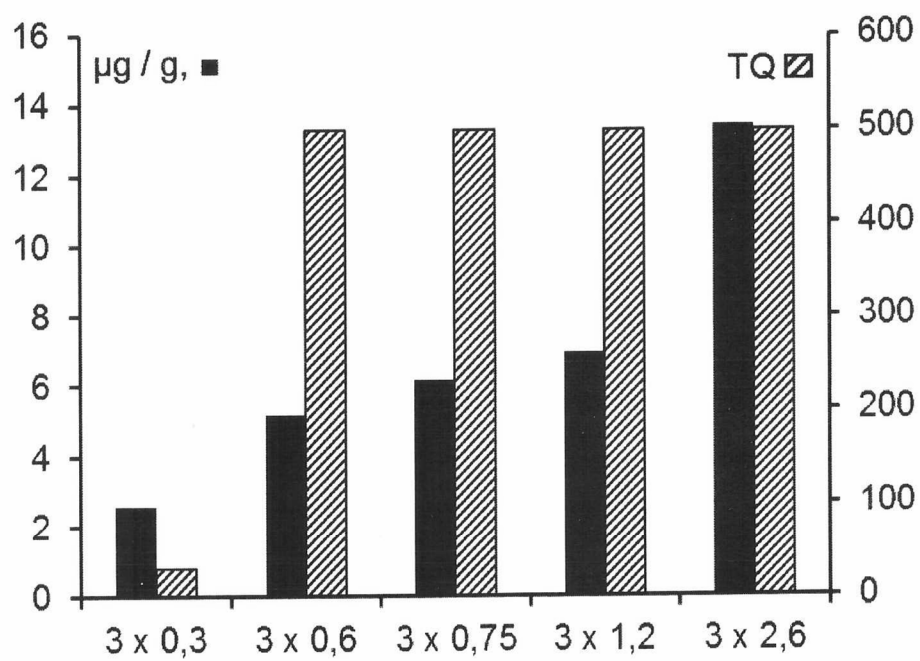


Fig 5