

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 358**

51 Int. Cl.:

**A01N 35/02** (2006.01)

**A01N 37/06** (2006.01)

**A01N 25/18** (2006.01)

**A01P 19/00** (2006.01)

**A01M 1/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2017** **PCT/EP2017/081026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018** **WO18114273**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2017** **E 17808437 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3550971**

54 Título: **Composición y procedimiento para atraer chinches**

30 Prioridad:

**20.12.2016 EP 16205486**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.03.2021**

73 Titular/es:

**NATTARO LABS AB (100.0%)**

**Medicon Village**

**223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**KNUDSEN, JETTE y**

**BÄCKMARK, MAGNUS**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 811 358 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

Composición y procedimiento para atraer chinches

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de las composiciones para atraer chinches, entre otras cosas, para capturar o detectar chinches. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona, y un procedimiento para usar la composición para atraer o detectar chinches.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La infestación de insectos en hábitats humanos ha aumentado en los últimos años. Una razón de este aumento es el desarrollo de especies de insectos resistentes que son prácticamente inmunes a los procedimientos de exterminio prevalentes. A modo de ejemplo, la población de chinches, que había sido casi erradicada en el mundo desarrollado en la década de 1940, se ha estado recuperando lentamente desde entonces. Además, la recuperación se ha acelerado desde mediados de la década de 1990.

Las chinches (*Cimex lectularius*, *Cimex hemipterus*) son insectos sin alas con exoesqueleto, del tamaño y la forma de una semilla de manzana. Prefieren espacios reducidos y oscuros. En consecuencia, prefieren esconderse en camas y hendiduras, y grietas en el piso/paredes y detrás de zócalos. Se alimentan de sangre, son activas por la noche y muerden cualquier área expuesta de la piel. Una serie de efectos adversos para la salud pueden ocurrir debido a las picaduras de chinches, incluidas erupciones cutáneas, reacciones alérgicas y/o angustia mental. Obviamente, el aumento de la población mencionado anteriormente ha contribuido a aumentar las picaduras de chinches y las afecciones relacionadas.

En la técnica, se conocen varios procedimientos para combatir la infestación de insectos en general y la de las chinches en particular.

Una forma de abordar dicho problema es someter, durante un período de tiempo determinado, el área infestada a una temperatura ya sea alta o baja, que sea perjudicial para las chinches. En consecuencia, para matar las chinches adultas, así como los huevos puestos, dicha área debe calentarse a 60 °C durante una hora o mantenerse por debajo de 18 °C durante al menos 48 horas.

Otro procedimiento de uso frecuente para combatir las chinches es esparcir tierra de diatomeas (DE, por sus siglas en inglés) en forma de polvo en el piso y/o a lo largo o detrás de los zócalos de la sala. Una vez que la chinche entra en contacto con la DE, piezas de con un tamaño de micrómetro sustancialmente en forma de aguja absorben la capa de cera en las chinches. Esto inicia un proceso de deshidratación irreversible en la chinche que finalmente la conduce a la muerte. Este procedimiento también puede usarse para combatir otros insectos que tienen propiedades y patrones de comportamiento similares.

Aun otros procedimientos proponen el uso de diferentes tipos de trampas diseñadas para atrapar chinches.

Sin embargo, es común para todos estos procedimientos la necesidad de atraer las chinches a la trampa o DE, o en cualquier caso la necesidad de detectar las chinches antes de comenzar a combatir las, o de detectar las chinches restantes después de los intentos de exterminio.

La solicitud de patente de los Estados Unidos 15/10.676 describe una composición para atraer y/o detener las chinches. El compuesto comprende al menos histamina o disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo. El compuesto típicamente comprende, además, (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal y 2-hexanona.

La patente de los Estados Unidos 7892528 describe métodos para atraer chinches mediante el uso de una composición que comprende nonanal, decanal, (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, (E,E)-2,4-octadienal, benzaldehído, alcohol bencílico, (+)-limoneno, (-)-limoneno y sulcatona.

La solicitud de patente internacional PCT/US2011/037688 describe procedimientos para atraer chinches mediante el uso, por ejemplo, de 2-hexanona en combinación con (E)-2-hexenal o (E)-2-octenal.

Gries y col.: "bed Bug Aggregation Pheromone Finally Identified", *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 54, núm. 4, describe una composición que comprende (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal y 2-hexanona.

La solicitud de patente internacional PCT/US2010/026938 describe una composición que comprende (E)-trans)-2-hexenal y (E)- (trans)-2-octenal.

La solicitud de patente de los Estados Unidos 13/335.389 describe un pesticida que comprende aceite Neem.

5

A pesar de estos avances recientes, aún persiste la necesidad de más composiciones y procedimientos para atraer chinches para permitir su detección y/o erradicación.

En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para atraer chinches.

10

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición para atraer chinches, composición que se puede usar en varios procedimientos para atraer chinches.

Un objeto adicional aun de la presente invención es proporcionar una composición que pueda formularse en diferentes

15

formas. Un objeto adicional aun de la presente invención es proporcionar una trampa para chinches, trampa que utiliza la composición para atraer chinches.

20 Un objeto adicional aun de la presente invención es proporcionar procedimientos para atraer y/o detectar chinches mediante el uso de la composición o la trampa.

## RESUMEN DE LA INVENCION

25 Al menos uno de los objetos anteriores, o al menos uno de los objetos que serán evidentes a partir de la descripción a continuación, se realiza según un primer aspecto de la invención logrado por una composición para atraer chinches, donde la composición comprende (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona. Por consiguiente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que estos cinco compuestos juntos atraen fuertemente las chinches, como se pone de manifiesto en la sección de ejemplos más abajo. Por consiguiente, la

30

composición puede usarse para atraer chinches con la intención de, por ejemplo, atraer las chinches a una trampa, y/o con la intención de hacer que las chinches se den a conocer, permitiendo así detectar una infestación de chinches.

Al menos uno de los objetos anteriores, o al menos uno de los objetos que serán evidentes a partir de la descripción a continuación, se realiza según un segundo aspecto de la presente invención logrado por una trampa para atrapar

35

chinches, trampa que comprende la composición según el primer aspecto de la presente invención para atraer las chinches.

Al menos uno de los objetos anteriores, o al menos uno de los objetos que resultarán evidentes a partir de la descripción a continuación, guarda conformidad con un tercer aspecto de la invención alcanzado, además, a través

40

de un procedimiento que consiste en atraer chinches que comprende la etapa de colocar una porción de la composición según el primer aspecto de la presente invención o la trampa según un segundo aspecto de la invención en un lugar en el que se sospeche que hay chinches presentes.

Al menos uno de los objetos anteriores, o al menos uno de los objetos que resultarán evidentes a partir de la descripción a continuación, guarda conformidad con un cuarto aspecto de la invención alcanzado, además, a través

45

de un procedimiento de detección de chinches que comprende la etapa de colocar una porción de la composición según el primer aspecto de la presente invención o la trampa según un segundo aspecto de la invención en un lugar en el que se sospeche que hay chinches presentes.

## 50 DESCRIPCIÓN DETALLADA

El primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición para atraer chinches, donde la composición comprende (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona.

55 Por consiguiente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que estos cinco compuestos juntos atraen fuertemente las chinches, como se pone de manifiesto en la sección de ejemplos más abajo. Por consiguiente, la composición puede usarse para atraer chinches con la intención de, por ejemplo, atraer las chinches a una trampa, y/o con la intención de hacer que las chinches se den a conocer, permitiendo así detectar una infestación de chinches.

60 La composición según el primer aspecto de la presente invención puede ser un atrayente, es decir, un atrayente de chinches. La composición es capaz de atraer chinches.

Por consiguiente, el primer aspecto de la presente invención puede así alternativamente ser considerado un atrayente de chinches que comprende (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona.

Además de atraer las chinches, la composición según el primer aspecto de la presente invención también puede ser capaz de detener a las chinches, es decir, hacer que las chinches permanezcan cerca de la composición. Por consiguiente, la composición según un primer aspecto de la presente invención puede ser capaz tanto de atraer chinches, es decir, hacer que las chinches se muevan hacia la composición, como de detener las chinches, es decir hacer que las chinches permanezcan una vez que se han movido cerca de la composición.

10 Cualquier referencia a los cinco compuestos debe entenderse como una referencia a (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona.

La chinche puede ser típicamente *Cimex lectularius* o *Cimex hemipterus*.

15 En el contexto de la presente invención, se contempla que algunas realizaciones de la composición podrían incluir además los (Z)-isómeros de (E)-2-hexenal y (E)-2-octenal.

En la realización preferida de la composición según el primer aspecto de la presente invención, la composición comprende de 0,5 a 2 partes, tales como 1 parte de (E)-2-hexenal, 2 a 5 partes de ácido (E)-2-hexenoico, 0,5 a 2 partes, como 1 parte de (E)-2-octenal, 1 a 10 partes de ácido 2-octenoico y 0,5 a 2 partes, como 1 parte, de 2-hexanona.

Más preferentemente, la composición comprende 1 parte de cada uno de los cinco compuestos.

Estas proporciones de los cinco compuestos han demostrado ser eficaces para atraer chinches, véase la sección de ejemplos.

En la realización preferida de la composición según el primer aspecto de la presente invención, la composición comprende ningún otro componente volátil además de (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona.

Los componentes volátiles pueden entenderse como compuestos químicos con alta presión de vapor a temperatura ambiente normal (20 °C), tal como cualquier compuesto orgánico que tenga un punto de ebullición inicial menor o igual a 250 °C (482 °F) medido a presión atmosférica estándar de 101,3 kPa.

35 Esto puede expresarse alternativamente como que (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona son los únicos componentes volátiles en la composición .

Preferentemente, la composición no contiene al menos uno, más preferentemente ninguno, de 4-oxo- (E)-2-hexenal, 4-oxo- (E)-2-octenal, limoneno, benzaldehído, sulcatona, octanal, nonanal, decanal, dimetil sulfuro, dimetil trisulfuro y 1-octen-3-ol.

Más preferentemente, la composición no comprende 4-oxo-(E)-2-hexenal y 4-oxo-(E)-2-octenal, ya que se identificó que estos compuestos no tienen un efecto atractivo, sino que tienen un efecto repulsivo, en las pruebas de pista, véase el ejemplo 2.

Preferentemente, la composición no debe contener ningún antioxidante, tal como ácido ascórbico. Esto se debe a que se descubrió que el ácido ascórbico, un antioxidante común, disminuía la vida útil de la composición.

En una realización específica, la composición según el primer aspecto de la presente invención consiste en (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona.

En la realización preferida de la composición según el primer aspecto de la presente invención, la composición comprende, además, un vehículo. Esto hace que la composición sea más fácil de administrar y manipular. El vehículo puede comprender un sólido, líquido o un gel. La composición puede formularse así como un líquido, un gel, un sólido (tal como una tableta o gránulo).

En la realización preferida de la composición según el primer aspecto de la presente invención, el vehículo se selecciona del grupo que consiste en gelatina y polietilenglicol (PEG), un polímero superabsorbente tal como poliacrilato de sodio, un aceite mineral, parafina y agua.

La gelatina y los polietilenglicoles (PEG) son vehículos preferidos porque son fáciles y económicos de usar, y porque los resultados de las pruebas, véase los ejemplos 2 y 4, han demostrado que estos vehículos permiten la liberación

de los cinco compuestos, es decir, vaporizados, a una tasa adecuada para proporcionar una composición para atraer chinches que se puede usar durante un tiempo suficientemente largo (como al menos 24 h, como al menos 72 h, como 24 - 144 h, como preferentemente hasta 3 semanas) para atraer chinches de manera eficaz.

- 5 La composición que incluye el portador puede, además, estar conformada y dimensionada, tal como moldeada, para afectar la velocidad a la que los cinco compuestos son liberados/evaporados del vehículo. Para obtener una mayor velocidad de liberación, la composición puede formarse en gránulos que proporcionan una superficie específica alta en peso de la composición. Para obtener lo contrario, es decir, una liberación lenta, la composición se puede formar en porciones o partes mayores. La composición puede cubrirse adicionalmente con un recubrimiento para disminuir  
10 aún más la velocidad de liberación de los cinco compuestos.

El PEG puede tener un peso molecular de entre 400 y 9500, y puede aparecer como un líquido (peso molecular inferior a 700), un semisólido (peso molecular entre 700 y 900) y como una hojuela o polvo sólido ceroso (peso molecular superior a 1000).

- 15 En la realización preferida de la composición según el primer aspecto de la presente invención, el vehículo comprende, o consiste en, PEG 4000 (CAS # 25322-68-3, peso molecular promedio entre 3600 y 4400).

- 20 Este polietilenglicol puede, en función de la forma final del vehículo, proporcionar una velocidad de liberación suficiente como para hacer que la composición sea eficaz por hasta 2 semanas, según la cantidad de la composición y la forma de la composición. Además, PEG 4000 es sólido a temperatura ambiente y, por lo tanto, es muy fácil de manipular y formar.

- 25 En la realización preferida de la composición según el primer aspecto de la presente invención, la composición consiste en un vehículo como se describió anteriormente y (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona. Como se muestra en la sección de ejemplos, las composiciones eficaces no necesitan contener compuestos adicionales.

- 30 En algunas realizaciones de la composición según el primer aspecto de la presente invención, la composición comprende de 50 a 600 mg/l, como 100-300 mg/l de (E)-2-hexenal, 100-1500 mg/l de ácido (E)-2-hexenoico, 50 a 600 mg/l, como 100-300 mg/l, de (E)-2-octenal, 100-3000 mg/l de ácido 2-octenoico y de 50 a 600 mg/l, como 100-300 mg/l, de 2-hexanona, basado en el volumen total de la composición.

- 35 En estas realizaciones, la composición comprende preferentemente un vehículo como se describe anteriormente.

Más preferentemente, la composición comprende 100 mg/l de cada uno de los cinco compuestos.

- 40 En algunas realizaciones, la composición comprende 10-300 mg/l de (E)-2-hexenal, 20-1500 mg/l de ácido (E)-2-hexenoico, 10-300 mg/l de (E)-2-octenal, 10-3000 mg/l de ácido 2-octenoico y 10-300 mg/l de 2-hexanona, basada en el volumen total de la composición.

En algunas realizaciones de la composición según el primer aspecto de la presente invención, una dosis de la composición comprende 0,1 a 100 g, tal como 0,5 a 10 g, tal como 0,5 a 3,5 g de la composición, o alternativamente, una dosis de la composición comprende 0,1 a 100 ml, tal como 0,5 a 10 ml, tal como 0,5 a 3,5 ml de la composición.

- 45 Como se muestra en la sección de ejemplos, donde los cebos, es decir, las dosis, de la composición tienen pesos, entre otros, de 0,9 g, estas dosis son capaces de atraer chinches. Dosis mayores proporcionan una mayor cantidad de los cinco compuestos para atraer las chinches durante más tiempo.

- 50 En estas realizaciones, la composición comprende preferentemente un vehículo como se describe anteriormente.

Debe entenderse que una dosis de la composición abarca una parte de la composición, es decir, un cebo. El término señuelo también puede usarse para una dosis o porción de la composición. El tamaño de una dosis depende, entre otras cosas, de por cuánto tiempo la dosis debe ser eficaz para atraer chinches, el tamaño del lugar donde se coloca  
55 la dosis y la temperatura en el lugar. Se puede seleccionar una dosis adecuada colocando diferentes dosis en el lugar donde se atraigan las chinches e identificando la dosis que atrajo las chinches con la eficacia y duración deseadas.

- 60 En algunas realizaciones de la composición según el primer aspecto de la presente invención, los volátiles emitidos por la composición, preferentemente por una dosis de la composición, a una temperatura de 20 °C y a una presión atmosférica estándar de 101,3 kPa, comprenden 0,001 a 37,4 % de (E)-2-hexenal, 0,01 a 2,2 % de ácido (E)-2-hexenoico, 40,4 a 90,9 % de (E)-2-octenal, 0,001 a 2,8 % de ácido 2-octenoico y 5,9 a 39,8 % de 2-hexanona, donde la suma de los porcentajes es menor o igual a 100 %.

Preferentemente, la suma de los porcentajes es igual a 100 %, es decir ningún otro volátil es emitido de la composición en estas condiciones

Alternativamente, la proporción de los cinco compuestos emitidos por la composición, preferentemente por una dosis de la composición, a una temperatura de 20 °C y una presión atmosférica estándar de 101,3 kPa, es 0,001 a 37,4 % de (E)-2-hexenal, 0,01 a 2,2 % de ácido (E)-2-hexenoico, 40,4 a 90,9 % de (E)-2-octenal, 0,001 a 2,8 % de ácido 2-octenoico y 5,9 a 39,8 % de 2-hexanona, donde la suma de los porcentajes es igual a 100 %.

Estos valores se basan en los valores mínimo y máximo de la proporción de los cinco compuestos medidos en los Ejemplos 1 y 4. Los volátiles emitidos por la composición pueden medirse, por ejemplo, colocando una porción o dosis de la composición en un recipiente en las condiciones anteriores y recogiendo el espacio de cabeza del recipiente y determinando la composición del espacio de cabeza por cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés). El espacio de cabeza debe recogerse 240 horas después de que la porción o dosis se coloque en el recipiente. El espacio de cabeza se puede analizar utilizando un cromatógrafo de gases (GC, serie Hewlett-Packard 6890) equipado con una columna capilar polar (Innowax; 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y espesor de película de 0,25 µm Agilent Technologies EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas (detector selectivo de masas Hewlett-Packard 5973 ). La temperatura del inyector puede ser 225 °C y la inyección sin divisiones. La temperatura del GC debe programarse durante 2 minutos a 40 °C seguido de un aumento gradual de 8°/min a 225 °C, donde la temperatura se mantuvo estable durante cinco minutos.

En una realización específica de la composición según el primer aspecto de la presente invención, la composición comprende, además, un insecticida.

El insecticida puede comprender, por ejemplo, piretrinas, desecantes de piretroides (como tierra de diatomeas (DE)), insecticidas bioquímicos (como aceite de neem prensado en frío), pirroles (clorfenapir), neonicotinoides y reguladores del crecimiento de insectos.

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a una trampa para atrapar chinches, donde la trampa comprende o contiene (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona, preferentemente proporcionada como la composición según el primer aspecto de la presente invención.

La trampa puede, por ejemplo, construirse como en la solicitud de patente internacional del solicitante WO2013115719. Alternativamente, la trampa puede ser del tipo caída de pozo que comprende un cuerpo en forma de cono con una entrada en la parte superior y la composición según el primer aspecto de la presente invención colocada en el interior, lo que hace que las chinches trepen por el exterior del cono y caigan en el interior del cono a través de la entrada.

La composición según el primer aspecto de la presente invención puede utilizarse para atraer chinches.

Por consiguiente, el tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para atraer chinches, que comprende la etapa de: i) colocar (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona en un lugar donde hay chinches presentes.

colocar los cinco compuestos en el lugar atraerá las chinches para moverse hacia los cinco compuestos. Esto permite capturar las chinches y/o exterminarlas.

Los cinco compuestos pueden estar separados entre sí, por ejemplo, como cinco composiciones diferentes, cada una de las cuales comprende, por ejemplo, un vehículo y uno de los cinco compuestos. Alternativamente, dos o más de los compuestos pueden combinarse en una sola composición. Sin embargo, preferentemente los cinco compuestos se proporcionan como la composición según el primer aspecto de la presente invención, o como la trampa según el segundo aspecto de la presente invención.

El cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar chinches que comprende la etapa de i) colocar (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona en un lugar donde se sospecha que hay chinches presentes.

Los cinco compuestos pueden estar separados entre sí, por ejemplo, como cinco composiciones diferentes, cada una de las cuales comprende, por ejemplo, un vehículo y uno de los cinco compuestos. Alternativamente, dos o más de los compuestos pueden combinarse en una sola composición. Sin embargo, preferentemente los cinco compuestos se proporcionan como la composición según el primer aspecto de la presente invención, o como la trampa según el segundo aspecto de la presente invención.

Por lo tanto, no solo la composición y la trampa según los aspectos primero y segundo de la presente invención se

pueden usar para atraer chinches en lugares donde hay chinches, además la composición y la trampa se pueden usar para detectar, es decir, atraer cualquier chinche que esté presente, si hay chinches presentes.

El lugar puede ser una cama, una habitación, un apartamento, una casa, un vehículo, una maleta o cualquier otro lugar donde haya chinches presentes o se sospeche que están presentes.

Cuando los cinco compuestos se proporcionan como la composición según el primer aspecto de la presente invención, se puede colocar una porción de la composición. Los cinco compuestos, la composición, la porción de la composición o la trampa pueden colocarse en el lugar durante 0-24 horas, 0-72 horas, 0-144 horas o incluso hasta tres semanas.

Múltiples porciones de la composición, o múltiples trampas, pueden colocarse en el lugar.

Atraer las chinches puede hacer que las chinches se muevan hacia la composición o la trampa.

La detección de chinches puede comprender observar chinches capturadas en la trampa, o de otra manera observar chinches, tal como en la proximidad de la composición o trampa.

Atraer y detectar chinches no necesita abarcar la detección o atracción de todas las chinches presentes, sino que basta con atraer o detectar al menos una chinche.

## EJEMPLOS

EJEMPLO 1: recolección de volátiles en el espacio de cabeza de las poblaciones de chinches

En esta prueba, se recogieron compuestos volátiles del espacio de cabeza de los recintos de prueba que albergan chinches. Se identificaron varios compuestos de ensayo potenciales para pruebas adicionales en las pruebas de pista, véase el ejemplo 2.

### 1.1. Materiales y procedimientos

Las chinches usadas en las réplicas I y III se originaron exclusivamente del cultivo de laboratorio de Nattaro alimentado con sangre de oveja, mientras que las réplicas II, IV y V contenían adultos alimentados con sangre humana de R. Naylor, tienda de Cimex, Reino Unido, y ninfas de 1.º y 2.º estadio del cultivo de Nattaro.

recipientes de plástico de 60 ml con tapas atornilladas se modificaron mediante orificios, de 1,8 cm de diámetro, en la parte inferior y en la tapa. Para evitar que las chinches escaparan, las redes de plástico de malla fina, que permitían el paso del aire a través del recipiente, se pegaron sobre los agujeros. Cada recipiente estaba equipado con un papel de filtro de 45 x 80 mm doblado varias veces para caber en el recipiente. Una réplica consistía en seis recipientes: cinco con 6, 12, 18, 24 o 48 ninfas alimentadas recientemente (1ª y 2ª fases), chinches hembras y machos y un recipiente que es un control sin insectos.

Para recolectar pasivamente (enflorado a través del papel) las emisiones de cada recipiente, se colocó una red adicional sobre la abertura sobre la cual se colocó un adsorbente.

### Muestras de enflorado

Los seis recipientes de una réplica se mantuvieron juntos y se trataron de la misma manera. Después de la instalación de las chinches y la adición de adsorbente para la recolección de enflorado, las chinches se dejaron tranquilas en una cámara climática a 25 ° C en un ciclo diario de luz/oscuridad de 8/16 h. Después de 6, 7 u 8 días, cada réplica se llevó al laboratorio y se retiró la tapa. Con una bomba accionada por batería, el adsorbente fue aspirado en un tubo de teflón equipado con un tapón de lana de vidrio en el extremo hacia la bomba. Cuando el adsorbente estuvo en el tubo de teflón, se insertó otro tapón de lana de vidrio en el otro extremo y la muestra estuvo lista para la extracción.

### Muestras de espacio de cabeza dinámico

Después de la recolección de las muestras de enflorado, se hicieron recolecciones de espacio de cabeza de cada recipiente usando una tapa especial en la que se insertó un tapón adsorbente. El espacio de cabeza de todos los recipientes en una réplica se recolectó simultáneamente en condiciones de oscuridad (excepto las primeras muestras de una réplica) mediante el uso de bombas de membrana operadas con batería. El flujo de aire a través de cada recipiente se ajustó a 35-40 ml/min. Las muestras de espacio de cabeza se recolectaron durante 2 horas para replicar una a tres después de la primera semana, pero se extendieron a 4-6 horas para replicar 4 y 5 y para todas las réplicas y recolecciones después de la segunda semana. Esto se hizo para obtener más material ya que las primeras muestras

eran muy débiles.

Se utilizó Tenax GR (tamaño de malla 60-80 Alltech, EE. UU.) como adsorbente para el espacio de la cabeza y las recolecciones de enflorado. Antes del uso, todos los adsorbentes se limpiaron con metanol, acetona y hexano en exceso. Para el enflorado, se usaron 60 mg para recolectar emisiones durante la primera semana después del inicio del experimento, seguido de 40 mg durante la segunda y tercera semana. Cada tapón se eluyó con 400 µl de hexano de alto grado. Se recogieron muestras de espacio de cabeza después de una semana y nuevamente después de dos semanas desde el inicio del experimento mediante el uso de tapones adsorbentes de 10 mg. Los tapones del espacio de cabeza se eluyeron con 250 µl de hexano de alto grado.

#### 10 Análisis:

Las muestras se eluyeron dentro de las 24 horas posteriores a la recolección, la mayoría de las muestras inmediatamente después de la recolección. Para fines de cuantificación, se añadieron 50 ng de estearato de metilo como patrón interno a todas las muestras. Todas las muestras se concentraron a temperatura ambiente hasta que quedaron entre 20 y 50 µl antes de los análisis.

Las muestras se analizaron mediante el uso de un cromatógrafo de gases (GC, serie Hewlett-Packard 6890) equipado con una columna capilar polar (Innowax; 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y espesor de película de 0,25 µm Agilent Technologies EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas (detector selectivo de masas Hewlett-Packard 5973). La temperatura del inyector fue de 225 °C y la inyección sin divisiones. La temperatura del GC se programó durante 2 minutos a 40 °C seguido de un aumento gradual de 8°/min a 225 °C, donde la temperatura se mantuvo estable durante cinco minutos. Los compuestos se identificaron contra los espectros y los tiempos de retención de los compuestos de referencia auténticos o, en algunos casos, contra las bibliotecas espectrales de ADAM y NIST2011.

La mayoría de los compuestos se cuantificaron manualmente mediante el uso de la contribución de iones principales y característicos y para obtener una aproximación de las cantidades de compuestos individuales, sus áreas se compararon con las del estándar interno agregado.

#### 30 1.2. Resultados

Todas las muestras recolectadas de recipientes que contenían chinches en una réplica se compararon con la muestra de control de esa réplica. Los compuestos que se presentaron en cantidades similares a las de la muestra de control se juzgaron como contaminaciones de fondo, mientras que se sugirió que aquellos que en cualquier muestra ocurrieron en más de cinco veces las cantidades de las muestras de control se originaban de las chinches. Las emisiones variaron entre las diferentes réplicas: por lo general, las réplicas II y V emitieron la mayor cantidad, seguida de la réplica IV. Las réplicas I y III siempre emitieron la menor cantidad de volátiles. Durante la primera semana a la densidad 12, las emisiones de cuatro de las cinco réplicas fueron altas y menos variables que en otras densidades durante la semana

1. (E)-2-octenal estuvo presente en todas las muestras y (E)-2-hexenal en la mayoría de las muestras que contenían chinches y los correspondientes isómeros (Z) se detectaron en las muestras más fuertes. Se detectaron 4-oxo- (E)-2-octenal y 4-oxo-(E)-2-hexenal en la mayoría de las muestras con mayor densidad de chinches, como fue el caso de (E)-2-octenoico y ácido (E)-2-hexenoico, mientras que (E)-2-octen-1-ol solo se detectó en muestras con cantidades muy altas de volátiles. Se detectaron varios otros compuestos en cantidades iguales a las encontradas en las muestras de control. Uno de estos es 2-hexanona.

Tabla 1 a continuación muestra la relación (%) de emisiones de chinches mantenidas a diferentes densidades. Las emisiones se recogieron pasivamente a través de enflorado durante tres semanas. Después de cada semana, durante tres semanas (S1, S2, S3), se recogió el adsorbente en la parte superior de cada recipiente experimental y se reemplazó con adsorbente limpio. El control sin chinches se mantuvo en el mismo recipiente que las muestras durante todo el experimento.

Tabla 1. Emisiones relativas de chinches (%).

| Densidad                                      |    | 6x3  | 12x3  | 18x3  | 24x3  | 48x3  | Control |
|-----------------------------------------------|----|------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Cantidad total<br>(ng/chinche<br>/semana)     | S1 | 31,2 | 38,4  | 30,6  | 26,2  | 20,5  |         |
|                                               | S2 | 31,5 | 8,5   | 16,3  | 20,0  | 9,7   |         |
|                                               | S3 | 12,8 | 8,2   | 6,3   | 18,5  | 7,9   |         |
| Cantidad total<br>Compuesto (ng/día/densidad) | S1 | 80,1 | 197,7 | 236,2 | 269,1 | 422,6 | 28,71   |
|                                               | S2 | 80,9 | 44,0  | 131,4 | 205,9 | 199,5 | 16,9    |
|                                               | S3 | 32,8 | 42,1  | 48,4  | 190,5 | 162,6 | 13,4    |



| Densidad                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    | 6x3  | 12x3  | 18x3  | 24x3 | 48x3 | Control |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------|-------|-------|------|------|---------|
| <b>a*</b> : (Z)-y (E)-2-hexenal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S1 | 18,0 | 16,7  | 13,4  | 15,0 | 13,7 | 21,0    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S2 | 10,5 | 12,4  | 9,1   | 14,0 | 9,5  | 15,1    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S3 | 8,7  | 7,4   | 4,7   | 8,0  | 4,7  | 7,8     |
| <b>b*</b> : ((Z)-y (E)-2-hexenal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | S1 | 77,0 | 78,5  | 82,7  | 78,5 | 80,1 | 68,5    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S2 | 86,4 | 86,5  | 88,2  | 81,5 | 86,4 | 77,8    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S3 | 82,8 | 87,3  | 89,4  | 88,1 | 90,5 | 82,8    |
| <b>c*</b> : 4-Oxo-(E)-2-hexenal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S1 | 0,51 | 0,73  | 0,89  | 0,83 | 0,43 | 2,4     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S2 | 0,88 | 0,085 | 0,51  | 0,42 | 0,33 | 1,4     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S3 | 1,5  | 0,85  | 1,2   | 0,36 | 0,71 | 1,7     |
| <b>h*</b> : (E)-2-Octen-1-ol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | S1 | 0    | 0     | 0,21  | 2,4  | 3,6  | 0,02    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S2 | 0    | 0     | 0,054 | 0,71 | 0,81 | 0       |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S3 | 0    | 0     | 0     | 0,34 | 0,55 | 0       |
| <b>d*</b> : 4-Oxo-(E)-2-octenal                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S1 | 3,2  | 3,1   | 1,8   | 1,8  | 1,6  | 5,4     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S2 | 2,0  | 0,50  | 1,7   | 2,6  | 2,2  | 3,5     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S3 | 5,2  | 3,8   | 3,6   | 2,0  | 2,2  | 5,7     |
| <b>e*</b> : Ácido (E)-hexenoico                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S1 | 0,59 | 0,37  | 0,34  | 0,69 | 0,27 | 1,5     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S2 | 0,20 | 0,30  | 0,21  | 0,39 | 0,37 | 1,3     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S3 | 0,63 | 0,39  | 0,52  | 0,42 | 0,39 | 1,1     |
| <b>f*</b> : Ácido (E)-2-octenoico                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | S1 | 0,77 | 0,59  | 0,66  | 0,81 | 0,44 | 1,2     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S2 | 0,14 | 0,14  | 0,21  | 0,33 | 0,42 | 0,83    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | S3 | 1,2  | 0,29  | 0,54  | 0,81 | 0,92 | 0,92    |
| *Los compuestos en la tabla 1 fueron inicialmente designaciones preliminares asignadas a*, b* y así sucesivamente, véase la tabla. Por las razones descritas a continuación, los compuestos de ensayo seleccionados para las pruebas de pista descritas en el ejemplo 2 en algunos casos diferían de los compuestos en la tabla 1. Por consiguiente, a los compuestos de ensayo reales se les han asignado las designaciones correspondientes, sin embargo, sin *. |    |      |       |       |      |      |         |

Con base en la tabla 1, se seleccionaron varios compuestos de ensayo para las pruebas de pista, como se describe en el ejemplo 2 a continuación.

5

EJEMPLO 2: pruebas de pista para determinar el contenido deseado de la composición para atraer chinches.

En estas pruebas, las chinches se colocaron en una pista y se les permitió moverse libremente mientras se registraban los patrones de movimiento incluido, en particular, el tiempo que las chinches pasaban cerca de cada una de las tres estaciones diferentes, cada estación comprende un cebo (compuesto de ensayo) o control.

10

### 2.1. Materiales y procedimientos

#### La pista

15

La pista constaba de una bandeja redonda de metal pintada de blanco (52 cm de diámetro) con un borde de 3,8 cm de alto. Espaciados uniformemente a medio camino entre el centro y la periferia, se perforaron tres agujeros (3,4 cm de diámetro). Para evitar que las chinches se escaparan, el borde se pintó con Insect-a-Slip (#2871C Fluon, BioQuip Products, Inc. 2321 E, Chadwick St., Rancho Dominguez, CA 90220), lo que dio como resultado una superficie resbaladiza no porosa en el borde de la bandeja.

20

Tres recipientes de plástico (34 mm de diámetro x 7 cm de alto), cada uno con un orificio cubierto de red (18 mm de diámetro) en la parte inferior para permitir el flujo de aire, se unieron debajo de los orificios en la parte inferior de la pista mediante el uso de arcilla masa. Al comienzo de un experimento, los compuestos/cebos y los controles se colocaron uno en cada recipiente debajo de la pista. Por lo general, se usaron un cebo (perfumado) y dos controles, pero en algunas instancias se probaron juntos dos cebos perfumados, pero solo se usó un control en los experimentos.

25

Sobre cada recipiente, se colocó una lámina redonda de vidrio convexo (6,8 cm de diámetro). Cada lámina de vidrio descansaba sobre dos cruces de plástico que las elevaban 3 mm por encima de la superficie de la pista. La lámina de vidrio estaba numerada según el cebo debajo de esta.

30

Compuestos de ensayo

Se usaron los siguientes compuestos de ensayo (con base en los resultados de la recolección de volátiles del ejemplo 1)

- 5
- a. (E)-2-hexenal
  - b. (E)-2-octenal
  - e. ácido (E)-2-hexenoico
  - f. ácido 2-octenoico
- 10
- g. 2-hexanona

Respecto de a y b, el ejemplo 1 muestra que los isómeros (E) y (Z) se encontraron como volátiles de las chinches, sin embargo, solo se eligió el isómero (E) para las pruebas de pista.

- 15
- Respecto de f, el ejemplo 1 mostró que se encontró el isómero (E). Sin embargo, para las pruebas de pista se utilizó una mezcla comercialmente disponible de ambos isómeros.

El ejemplo 1 identificó adicionalmente (E)-2-octen-1-ol, sin embargo, este compuesto no se utilizó en las pruebas de pista.

- 20
- El ejemplo 1 identificó adicionalmente:

- c. 4-Oxo-(E)-2-hexenal, y
- d. 4-Oxo-(E)-2-octenal.

- 25
- Aunque inicialmente estaba destinado a su uso en la prueba de pista, se descubrió rápidamente que los cebos (formulados mediante el uso de 3 % en peso de metilcelulosa) que contenían estos compuestos comenzaron a descomponerse inmediatamente a temperatura ambiente. Debido a esto, y debido a que estos compuestos solo se encuentran en las ninfas y no mostraron ningún efecto atractivo en las pruebas iniciales de pista (que muestran valores
- 30
- iguales o inferiores a los controles), no se estudiaron más en las pruebas de pista.

Respecto de g, este compuesto se identificó en pequeñas cantidades en el ejemplo 1. Sin embargo, se incluyó en las pruebas de pista para probar al menos un compuesto del grupo de compuestos que se encontraron en el espacio de cabeza y las muestras de enflorado en concentraciones inferiores a 5 veces la concentración en el control.

- 35
- Vehículos

Para los experimentos iniciales, con el objetivo de encontrar una combinación atractiva de los compuestos de ensayo, se usaron dos tipos de gelatina como vehículos de los compuestos para formar cebos

- 40
- cebos de gelatina y los controles correspondientes se presentaron en pequeñas tapas con aproximadamente 0,8 ml de gelatina en cada uno. Los cebos de gelatina contenían 100 mg/l (10-4) o 10 mg/l (10-5) de cada uno de los uno o más compuestos de ensayo probados en las pruebas de pista.

- 45
- Las pruebas iniciales, véase las tablas 2 y 3 en la sección de resultados, se prepararon disolviendo los compuestos de ensayo en agua desmineralizada y mezclándolos con una solución enfriada (80 % del volumen total) de gelatina (gelatina ácida de hueso Bloom 250, 3 % en peso) disuelto en agua desmineralizada. Los químicos de cebo y opcionalmente el ácido ascórbico antioxidante se disolvieron en 20 % del volumen total de agua utilizada.

- 50
- La gelatina se disolvió en agua calentándola a aproximadamente 40 ° C bajo agitación constante. Cuando todos los copos/gránulos de gelatina se disolvieron, la suspensión se enfrió a 20 °C y se añadieron los compuestos de ensayo, con o sin un antioxidante. Inmediatamente después, la solución gelatinosa se pipeteó en viales y se selló/cerró. Para los controles, se prepararon soluciones similares que contenían agua y gelatina con o sin ácido ascórbico.

- 55
- Con respecto al ácido ascórbico, este antioxidante se incluyó en algunos cebos, sin embargo, se descubrió que degradaba los cebos y daba lugar a una menor eficacia de los cebos. La inclusión de ácido ascórbico se suspendió así posteriormente.

- Las pruebas posteriores, véase las tablas 4 y 5 en la sección de resultados, se prepararon mediante el uso de gelatina
- 60
- Tørsløffs, gelatina disponible comercialmente para uso doméstico de los consumidores, debido a la inesperada falta de disponibilidad de la gelatina utilizada para las pruebas iniciales. Estos cebos se prepararon disolviendo el compuesto sólido e en los compuestos líquidos a, b, f y g y agregando 20 % del volumen total de agua a esta solución,

después de lo cual se mezcló con un 2 % en peso refrigerado de solución de gelatina Tørsleffs. La solución se vertió en tubos de papel de aluminio herméticos y se almacenó en el refrigerador hasta su uso.

Las pruebas iniciales, véase las tablas 6 y 7 en la sección de resultados, se prepararon disolviendo los compuestos de ensayo en agua desmineralizada y mezclándolos con un superabsorbente, 0,5 % en peso, disuelto en agua desmineralizada. El superabsorbente se obtuvo de un pañal libero. Los compuestos de ensayo se disolvieron en 20 % del volumen total del agua utilizada.

## 2.2. Diseño del estudio

Las chinches, diez a la vez, se introdujeron en viales separados en el medio de la pista y simultáneamente se inició la grabación de vídeo. La sala de prueba estaba iluminada con luz roja y en un estado tardío con luz infrarroja. Las chinches fueron seguidas durante 30 minutos. Al final del período experimental de 30 minutos, se puntuó el número de chinches en cada recipiente, y debajo o en el borde de la lámina de vidrio convexa sobre cada recipiente. Se hace referencia a los resultados como la distribución final de las chinches. La posición final no se registró durante los primeros experimentos.

Cada grabación de vídeo fue vista por un operador y se contó el número de chinches que ingresaron debajo de cada lámina de vidrio durante el período de 30 minutos. No fue posible realizar un seguimiento de las chinches individuales y, por lo tanto, la misma chinche pudo haberse puntuado en más de una posición y también en la misma posición más de una vez si salía y regresaba. Por lo tanto, la puntuación de actividad durante el experimento no excluye la seudorreplicación.

## 2.3. Estadísticas

El promedio de visitas a cebos y controles, su desviación estándar y su intervalo de confianza (CI, por sus siglas en inglés) del 95 % se calcularon para la actividad durante el experimento y para las posiciones finales de las chinches cuando se registraron. Todas las figuras y tablas incluyen el intervalo de confianza (CI) del 95%, que es una medida conservadora de membresía. Las diferencias en el CI indican una diferencia estadísticamente significativa en el nivel del 5 %.

## 2.4. Resultados

La Tabla 2 a continuación muestra la actividad de las chinches a los cebos formulados en gelatina Tørsleffs durante los 30 minutos de la prueba de pista en cuatro experimentos diferentes (Ej. N.º 1-4). La Tabla 3 muestra la distribución al final de los experimentos para los mismos cebos. Se usaron cantidades iguales de los compuestos de ensayo. La concentración de cada compuesto de ensayo fue  $10^{-4}$ , es decir, 100 mg/l.

Tabla 2. Actividad de las chinches: cebos de gelatina de hueso ácido

| Ej. N.º | sexo   | cebo    | X±DE       | CI   | min | máx. | N  | Sign.* |
|---------|--------|---------|------------|------|-----|------|----|--------|
| 1       | hembra | H2O     | 3,8 ± 2,14 | 1    | 2,8 | 4,8  | 20 | a      |
| 1       | Hembra | H20+asc | 3,9 ± 2,59 | 1,21 | 2,7 | 5,1  | 20 | ab     |
| 1       | hembra | abef    | 6,3 ± 3,19 | 1,49 | 4,8 | 7,7  | 20 | b      |
| 2       | macho  | H2O     | 4,0 ± 2,68 | 1,25 | 2,7 | 5,3  | 20 | A      |
| 2       | macho  | H20+asc | 5,1 ± 3,16 | 1,48 | 3,6 | 6,6  | 20 | ab     |
| 2       | macho  | abef    | 7,2 ± 2,91 | 1,36 | 5,8 | 8,5  | 20 | b      |
| 3       | hembra | H20+asc | 3,4 ± 1,75 | 0,93 | 2,4 | 4,3  | 16 | A      |
| 3       | hembra | ab      | 5,5 ± 2,83 | 1,51 | 4   | 7    | 16 | A      |
| 3       | hembra | ef      | 3,4 ± 1,75 | 0,93 | 2,5 | 4,4  | 16 | A      |
| 4       | macho  | H20+asc | 4,7 ± 2,72 | 1,27 | 3,4 | 5,9  | 20 | A      |
| 4       | macho  | ab      | 6,5 ± 4,06 | 1,9  | 4,6 | 8,3  | 20 | A      |
| 4       | macho  | ef      | 6,5 ± 3,05 | 1,43 | 5,1 | 7,9  | 20 | A      |

\*Las filas que no comparten la misma letra (a, b, c) son significativamente diferentes.

Tabla 3. Distribución al final del experimento: cebos de gelatina ácida de huesos

| Ej. N.º | sexo   | cebo    | X±DE       | Cl   | min | máx. | N  | Sign.* |
|---------|--------|---------|------------|------|-----|------|----|--------|
| 1       | hembra | H2O     | 2,6 ± 1,76 | 0,82 | 1,7 | 3,4  | 20 | A      |
| 1       | hembra | H2O+asc | 2,0 ± 1,62 | 0,76 | 1,2 | 2,8  | 20 | A      |
| 1       | hembra | abef    | 3,5 ± 1,76 | 0,82 | 2,6 | 4,3  | 20 | A      |
| 2       | macho  | H2O     | 1,9 ± 1,52 | 0,71 | 1,2 | 2,6  | 20 | A      |
| 2       | macho  | H2O+asc | 2,1 ± 1,37 | 0,64 | 1,5 | 2,7  | 20 | A      |
| 2       | macho  | abef    | 2,7 ± 2,35 | 1,1  | 1,6 | 3,7  | 20 | A      |
| 3       | hembra | H2O+asc | 1,7 ± 1,44 | 0,58 | 1,1 | 2,3  | 26 | A      |
| 3       | hembra | ab      | 3,5 ± 1,9  | 0,77 | 2,7 | 4,3  | 26 | b      |
| 3       | hembra | ef      | 1,5 ± 1,5  | 0,61 | 0,9 | 2,1  | 26 | A      |
| 4       | macho  | H2O+asc | 2,3 ± 1,53 | 0,71 | 1,6 | 3    | 20 | A      |
| 4       | macho  | ab      | 2,7 ± 1,66 | 0,78 | 1,9 | 3,4  | 20 | A      |
| 4       | macho  | ef      | 2,6 ± 1,67 | 0,78 | 1,8 | 3,4  | 20 | A      |

\*Las filas que no comparten la misma letra (a, b) son significativamente diferentes.

Como se ve en las tablas 2 y 3, la única diferencia significativa en la actividad de las chinches con respecto al control (H2O) se observa en los experimentos 1 y 2 para el cebo con la combinación abef de compuestos de ensayo.

5

Para la distribución final de las chinches, todos los cebos, excepto la combinación ab, no muestran una diferencia significativa con respecto al control.

La combinación ef no pudo proporcionar un efecto de atracción en estos experimentos.

10

Para los experimentos posteriores, se añadió el compuesto g (2-hexanona) a la combinación abef para ver si este compuesto, que solo se encontró en concentraciones muy bajas en el ejemplo 1, podría tener algún efecto.

Por consiguiente, la Tabla 4 a continuación muestra la actividad de las chinches en relación con los cebos formulados en gelatina Tørsleffs durante los 30 minutos de la prueba de pista en cuatro experimentos diferentes (Ej. N.º 5-8).

15

La Tabla 5 muestra la distribución al final de los experimentos para los mismos cebos.

Se usaron cantidades iguales de los compuestos de ensayo. La concentración de cada compuesto de ensayo fue 10<sup>-4</sup>, es decir, 100 mg/l.

20

Tabla 4. Actividad de las chinches- Cebos de gelatina Tørsleffs

| Ej. N.º | sexo   | cebo  | X±DE        | Cl   | min  | máx. | N  | Sign.* |
|---------|--------|-------|-------------|------|------|------|----|--------|
| 5       | hembra | H2O   | 3,3 ± 3,2   | 1,50 | 1,80 | 4,80 | 20 | A      |
| 5       | hembra | abef  | 4,9 ± 2,94  | 1,37 | 3,53 | 6,27 | 20 | a      |
| 5       | hembra | abefg | 5,0 ± 3,73  | 1,74 | 3,26 | 6,74 | 20 | a      |
| 6       | macho  | H2O   | 5,4 ± 3,60  | 1,7  | 3,7  | 7,1  | 20 | a      |
| 6       | macho  | abef  | 9,3 ± 6,67  | 3,1  | 6,2  | 12,4 | 20 | ab     |
| 6       | macho  | abefg | 11,5 ± 5,38 | 2,5  | 9,0  | 14,0 | 20 | b      |
| 7       | hembra | H2O   | 2,3 ± 2,03  | 0,98 | 1,34 | 3,29 | 19 | a      |
| 7       | hembra | H2O   | 2,4 ± 2,29  | 1,11 | 1,32 | 3,53 | 19 | a      |
| 7       | hembra | abefg | 7,5 ± 2,78  | 1,34 | 6,19 | 8,86 | 19 | b      |
| 8       | macho  | H2O   | 1,75 ± 1,48 | 0,69 | 1,06 | 2,44 | 20 | a      |
| 8       | macho  | H2O   | 2,55 ± 2,39 | 1,12 | 1,43 | 3,67 | 20 | a      |
| 8       | macho  | abefg | 6,4 ± 2,54  | 1,19 | 5,21 | 7,59 | 20 | b      |

\*Las filas que no comparten la misma letra (a, b) son significativamente diferentes.

Tabla 5. Distribución al final de los experimentos: cebos de gelatina Tørsleffs

| Ej. N.º | sexo   | cebo  | X±DE        | CI   | min  | máx. | N  | Sign.* |
|---------|--------|-------|-------------|------|------|------|----|--------|
| 5       | hembra | H2O   | 1,5 ± 1,50  | 0,7  | 0,8  | 2,2  | 20 | A      |
| 5       | hembra | abef  | 2,3 ± 2,11  | 1,0  | 1,3  | 3,3  | 20 | ab     |
| 5       | hembra | abefg | 3,1 ± 2,00  | 0,9  | 2,2  | 4,0  | 20 | b      |
| 6       | macho  | H2O   | 1,45 ± 1,76 | 0,8  | 0,6  | 2,3  | 20 | A      |
| 6       | macho  | abef  | 1,8 ± 1,96  | 0,9  | 0,9  | 2,7  | 20 | A      |
| 6       | macho  | abefg | 4,7 ± 2,54  | 1,2  | 3,5  | 5,8  | 20 | b      |
| 7       | hembra | H2O   | 1,0 ± 1,07  | 0,49 | 0,56 | 1,54 | 21 | A      |
| 7       | hembra | H2O   | 1,6 ± 2,11  | 0,96 | 0,66 | 2,58 | 21 | A      |
| 7       | hembra | abefg | 6,0 ± 2,21  | 1,01 | 4,99 | 7,01 | 21 | b      |
| 8       | macho  | H2O   | 1,1 ± 1,17  | 0,55 | 0,55 | 1,65 | 20 | A      |
| 8       | macho  | H2O   | 1,4 ± 1,39  | 0,65 | 0,75 | 2,05 | 20 | a      |
| 8       | macho  | abefg | 5,2 ± 2,4   | 1,12 | 4,08 | 6,32 | 20 | b      |

\*Las filas que no comparten la misma letra (a, b) son significativamente diferentes.

5 Como se ve en las tablas 4 y 5, las chinches visitaron los cebos con abefg, es decir, los cinco compuestos de la composición según el primer aspecto de la presente invención, más veces que los otros cebos y controles.

Por consiguiente, sorprendentemente, la adición del compuesto de ensayo g (2-hexanona) tuvo un fuerte efecto sobre el atractivo del cebo a pesar de que este compuesto solo se encuentra en baja concentración en el ejemplo 1.

10

Mientras que la combinación de compuestos de ensayo abefg solo arrojó diferencias estadísticamente significativas en la actividad, en relación con el control, (tabla 4) para los experimentos 6, 7 y 8, cabe notar que en todos se observó una diferencia estadísticamente significativa en relación con el control en todos los experimentos 5-8 al final de los experimentos (tabla 5)

15

Con respecto a la diferencia entre la combinación abefg y la combinación abefg, se observa que en ninguno de los experimentos en las tablas 4 y 5 la combinación abef muestra una diferencia significativa en relación con el control.

20 Por consiguiente, se realizaron pruebas adicionales mediante el uso de la combinación abefg de compuestos de ensayo para mostrar que esta combinación podría formularse también en otros vehículos.

Las tablas 6 y 7 muestran los resultados para cebos que utilizan un superabsorbente como vehículo.

25 Se usaron cantidades iguales de los compuestos de ensayo. La concentración de cada compuesto de ensayo fue 10<sup>-4</sup>, es decir, 100 mg/l.

Tabla 6. Actividad durante el experimento - superabsorbente

| Ej. N.º | sexo   | cebo  | X±DE       | CI   | min | máx. | N  | Sign.* |
|---------|--------|-------|------------|------|-----|------|----|--------|
| 9       | hembra | H2O   | 2,9 ± 2,13 | 1    | 1,9 | 3,8  | 20 | ac     |
| 9       | hembra | H2O   | 2,6 ± 2,11 | 0,99 | 1,6 | 3,6  | 20 | ab     |
| 9       | hembra | abefg | 4,7 ± 1,98 | 0,93 | 3,7 | 5,7  | 20 | c      |
| 10      | macho  | H2O   | 2,3 ± 1,69 | 0,79 | 1,5 | 3,1  | 20 | a      |
| 10      | macho  | H2O   | 2,0 ± 1,88 | 0,88 | 1,1 | 2,8  | 20 | a      |
| 10      | macho  | abefg | 5,9 ± 2,16 | 1,01 | 4,8 | 6,9  | 20 | b      |

\*Las filas que no comparten la misma letra (a, b,) son significativamente diferentes.

Tabla 7. Distribución al final del experimento- superabsorbente

| Ej. N.º | sexo   | cebo  | X±DE       | CI   | min | máx. | N  | Sign.* |
|---------|--------|-------|------------|------|-----|------|----|--------|
| 9       | hembra | H2O   | 1,6 ± 1,35 | 0,63 | 1   | 2,2  | 20 | a      |
| 9       | hembra | H2O   | 1,6 ± 1,57 | 0,73 | 0,9 | 2,3  | 20 | a      |
| 9       | hembra | abefg | 3,0 ± 1,49 | 0,7  | 2,3 | 3,7  | 20 | b      |
| 10      | macho  | H2O   | 1,3 ± 1,13 | 0,53 | 0,8 | 1,8  | 20 | a      |
| 10      | macho  | H2O   | 1,0 ± 1,34 | 0,63 | 0,4 | 1,6  | 20 | a      |
| 10      | macho  | abefg | 4,6 ± 2,37 | 1,11 | 3,5 | 5,7  | 20 | b      |

\*Las filas que no comparten la misma letra (a, b) son significativamente diferentes.

Como se ve en las tablas 6 y 7, la combinación abefg de los compuestos de ensayo proporcionó un efecto significativo, en relación con el control, para atraer chinches, también cuando se utilizó el superabsorbente como vehículo.

A modo de resumen de los resultados en las tablas 4-7, vale la pena señalar que la combinación abefg de los compuestos de ensayo representa un atrayente estadísticamente significativo, en relación con el control, hacia las chinches tanto hembras como machos.

#### EJEMPLO 2bis: pruebas sustractivas adicionales

Para probar cualquier efecto de agregar los dos ácidos, ácido (E)-2-hexenoico (e) y ácido 2-octenoico (f), a las tres primeras sustancias químicas base (abg) de la composición del cebo se realizaron pruebas sustractivas. Se prepararon cebos/señuelos de chinches a razón de 100 mg/l de cada uno de los compuestos en las siguientes combinaciones: abg, abeg, abfg y se probó el atractivo para las chinches de estas mezclas en pistas.

Los cebos/señuelos se prepararon como anteriormente en una solución al 2% de gelatina de Törsleffs y cada combinación se sometió a prueba contra 2 muestras de control de una solución de gelatina sin productos químicos.

En estas pruebas adicionales, se observaron las posiciones finales de las chinches al final de cada prueba de 30 minutos. Cada prueba de las combinaciones anteriores se repitió 20 veces y cada prueba incluyó diez chinches hembras o diez machos.

Estadísticas: se calculó un modelo lineal generalizado de dos vías (GLM, por sus siglas en inglés) con datos de recuento distribuidos por Poisson con el número de chinches atraído por un cebo como variable dependiente y con perfume/cebo y el sexo como factores. Ambos factores, sexo y perfume, fueron estadísticamente significativos (véase los resultados) y para explorar los datos se realizó un GLM adicional para cada sexo por separado con el perfume/cebo como la variable dependiente

En total, se utilizaron 162 filas de datos en el análisis: 82 filas relacionadas con hembras y 80 con machos. 42 filas relacionadas con la combinación abefg, y 40 filas cada una para las combinaciones restantes abeg, abfg y abg.

#### Resultados:

La distribución al final de los experimentos se muestra en la tabla 5bis a continuación.

Ambos factores, sexo (Wald Chi2(df=1)=8,192, p=0,004) y perfume (Wald Chi2(df=3) 10,285, p=0,016) y su interacción (Wald Chi2(df=3)= 12.412, p=0,006) son estadísticamente significativos

El efecto del perfume en las hembras fue estadísticamente significativo (Wald Chi2 (df=3)=21,133, p<0,000) y la comparación para las hembras de abg a abeg, abfg y abefg reveló una diferencia estadísticamente significativa en la atracción a abefg y abg (Wald Chi2 (df=1)=168,095, p=0,008), es decir, entre el cebo/señuelo con y sin los ácidos, mientras que no hubo diferencias significativas entre abg y abeg y abfg, Wald Chi2 (df=1)=2,178, p=0,140 y Wald Chi2 (df=1)=0,515, p=0,473, respectivamente.

Para los machos no hubo diferencias estadísticamente significativas en la atracción a los cuatro cebos (Wald Chi2(df=3)=1,493, p=0,684), véase la tabla 5ter a continuación.

Tabla 5bis. Distribución al final de los experimentos: cebos de gelatina Tørsleffs

| Ej. N.º | sexo   | cebo  | X±DE       | N  | Sign.* |
|---------|--------|-------|------------|----|--------|
|         | hembra | H2O   | 1,4 ± 2,19 | 20 | a      |
|         | hembra | H2O   | 0,4 ± 0,75 | 20 | a      |
|         | hembra | abg   | 4,2 ± 3,15 | 20 | b      |
|         | macho  | H2O   | 0,8 ± 0,95 | 20 | a      |
|         | macho  | H2O   | 1,2 ± 1,51 | 20 | a      |
|         | macho  | abg   | 4,7 ± 2,83 | 20 | b      |
|         | hembra | H2O   | 1,2 ± 1,27 | 20 | a      |
|         | hembra | H2O   | 1,0 ± 1,10 | 20 | a      |
|         | hembra | abeg  | 3,3 ± 2,00 | 20 | b      |
|         | macho  | H2O   | 0,7 ± 1,17 | 20 | a      |
|         | macho  | H2O   | 0,9 ± 0,91 | 20 | a      |
|         | macho  | abeg  | 5,5 ± 2,21 | 20 | b      |
|         | hembra | H2O   | 1,0 ± 1,36 | 20 | a      |
|         | hembra | H2O   | 1,0 ± 1,57 | 20 | a      |
|         | hembra | abfg  | 3,7 ± 2,99 | 20 | b      |
|         | macho  | H2O   | 1,0 ± 1,57 | 20 | a      |
|         | macho  | H2O   | 1,4 ± 2,06 | 20 | a      |
|         | macho  | abfg  | 5,3 ± 2,40 | 20 | b      |
| 7       | hembra | H2O   | 1,0 ± 1,07 | 22 | a      |
| 7       | hembra | H2O   | 1,6 ± 2,11 | 22 | a      |
| 7       | hembra | abefg | 6,0 ± 2,21 | 22 | b      |
| 8       | macho  | H2O   | 1,1 ± 1,17 | 20 | a      |
| 8       | macho  | H2O   | 1,4 ± 1,39 | 20 | a      |
| 8       | macho  | abefg | 5,2 ± 2,4  | 20 | b      |

\*Las filas que no comparten la misma letra (a, b) son significativamente diferentes.

Tabla 5ter. Resultados del modelo lineal generalizado

| Parámetro           | Wald Chi2 | Significación |
|---------------------|-----------|---------------|
| Sexo (macho/hembra) | 8,192     | 0,004         |
| perfume/cebo        | 10,285    | 0,016         |
| Sexo*perfume        | 12,412    | 0,006         |
| Perfume (hembra)    | 21,133    | 0,000         |
| abefg-abg (hembra)  | 168,095   | 0,008         |
| abeg-abg (hembra)   | 2,178     | 0,140         |
| abfg-abg (hembra)   | 0,515     | 0,473         |
| perfume (macho)     | 1,493     | 0,684         |

5

## Discusión

En general, las hembras se sienten más atraídas por el cebo/señuelo con los cinco componentes, véase tabla 5bis y 10 5ter arriba, un 30 % a 55 % más de hembras se sintió atraído hacia el cebo completo (abefg) que hacia cualquiera de las otras combinaciones. Las pruebas con uno u otro ácido (e o f) faltante son las que menos atraen a las hembras.

En general, los machos parecen indiferentes a la presencia de ácidos, aunque se atraen números ligeramente más altos a cualquier cebo que contenga uno o ambos ácidos.

La atracción mayor estadísticamente significativa ( $p=0,008$ ) al cebo/señuelo que contiene los cinco compuestos (abefg) con e:ácido (E)-2-hexenoico, f: ácido 2-octenoico, a:(E)-2-hexenal, b:(E)-2-octenal y g:2-hexanona, que al señuelo (abg) sin ácido (E)-2-hexenoico y ácido 2-octenoico, apoya la capacidad de los ácidos de atraer especialmente chinches hembras en comparación con cualquiera de los otros cebos probados.

Conclusión:

La combinación (abefg) de (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, 2-hexanona, ácido (E)-2-hexenoico y ácido 2-octenoico ejerce la mayor atracción en las chinches hembras y casi la mayor atracción también en los machos. Los dos ácidos muestran un claro efecto sinérgico en las hembras, pero no en los machos. Sin embargo, una sola chinche hembra embarazada es lo que se necesita para fundar una nueva población = una nueva infestación no deseada y, por lo tanto, es deseable poder atraer chinches hembras sobre cualquier otra chinche (machos y ninfas). Sin embargo, el cebo/señuelo abefg es casi tan eficiente para atraer machos como para atraer hembras. Sin la combinación de ambos ácidos (ef), la eficacia de la atracción disminuye significativamente para las hembras, pero no tanto para los machos.

EJEMPLO 3: formulación de cebos de PEG

Este ejemplo describe cómo la combinación abefg de compuestos de ensayo puede formularse en polietilenglicol, PEG.

### 3.1. Materiales y procedimientos

cebos de PEG se prepararon con los cinco químicos a, b, e, f y g disueltos/dispersos en PEG200 (5 %) y luego se mezclaron con PEG4000 fundido (temperatura de fusión 68 °C). Para lograr una buena mezcla de PEG200 con los productos químicos y PEG4000, se añadió PEG200 con los productos químicos disueltos a un recipiente cerrado y se añadió el PEG4000 derretido, y se usó un agitador vigoroso a baja velocidad para mezclar las dos soluciones durante un minuto. Inmediatamente después, antes de que el cebo PEG se solidificara, se vertió en un molde de cubitos de hielo. El molde con cebos de PEG se enfrió durante 10 minutos en un congelador, después de lo cual los cubos de cebo, cada uno con un peso de aproximadamente 3 g, se envasaron en tubos de papel de aluminio herméticos y se almacenaron en el refrigerador.

Los cebos de PEG contenían 100, 200 o 300mg/l de a, b y g, y 100, 200, 300, 500 o 1000 mg/l de e y f.

EJEMPLO 4: mediciones de volátiles de los cebos

Uno de los cebos utilizados en la prueba de pista se colocó en un recipiente y el espacio de cabeza dinámico se recogió como se describe en el ejemplo 1 y se analizó usando cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS).

La proporción de los diferentes compuestos en el espacio de cabeza se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. abefg en 1:1:1:1:1 en 100 mg/l de gelatina de cada compuesto

| CANTIDAD<br>nanogramo/hora | Muestra n.º<br>15:209-213 | Muestra n.º<br>15:215-219 | Muestra n.º<br>15:245.1-5 | Muestra n.º<br>16:02.1-5 | Muestra n.º<br>16.37-40 |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| (Z)- y (E)-2-hexenal       | 565,6                     | 234,6                     | 136,3                     | 102,2                    | 258,3                   |
| Ácido (E)-hexenoico        | 0,2                       | 3,1                       | 0                         | 1,4                      | 0,08                    |
| (Z)- y (E)-2-hexenal       | 914,5                     | 477,6                     | 438,5                     | 405,2                    | 349,9                   |
| Ácido (E)-octenoico        | 0                         | 0,8                       | 0                         | 0                        | 0,01                    |
| 2-hexanona                 | 429,1                     | 310,3                     | 168,2                     | 76,1                     | 402,0                   |
| SUMA ng/h                  | 1909,4                    | 1026,5                    | 743,0                     | 584,9                    | 1010,3                  |

EJEMPLO 5: pruebas de mesocosmos para determinar la eficacia de la composición para atraer chinches.

En las pruebas de mesocosmos, la capacidad de la composición, según el primer aspecto de la presente invención, para atraer chinches se probó en un mesocosmos, es decir, el entorno de prueba con el objetivo de simular mejor el



hábitat natural de las chinches. Las pruebas de mesocosmos se realizaron con un 2% de gel de gelatina Tørsleffs que comprende los cinco compuestos formulados como en el ejemplo 1 anterior y en proporciones de (1:1:1:1:1, conc.  $10^{-4}$  de cada compuesto).

## 5 5.1 Materiales y procedimientos

El mesocosmos medía 78x56x18 cm y estaba alojado en un almacenamiento de plástico IKEA "SAMLÄ" de 55 litros contenido con una tapa de plástico, la tapa tenía un orificio de ventilación cubierto con malla fina (8 cm de diámetro, cuatro en total) en cada esquina de la tapa. Los cebos (2,5-3,0 g) se aplicaron en trampas Nattaro Scout, que son trampas del tipo caída de pozo construidas para permitir que las chinches pasen por una abertura en la parte superior de un recinto en forma de cono para caer en el interior de la trampa, de donde no pueden salir. El cebo fue formulado como un 2% de gel de gelatina que contenía 100mg/l, es decir,  $10^{-4}$  g/l de cada uno de los productos químicos abefg, y además comprendía ácido ascórbico como antioxidante. Los cebos de control sin abefg se formularon de manera similar. Los cebos y los cebos de control se produjeron como se describe anteriormente. Cada mesocosmos contenía dos trampas Nattaro Scout, una con un cebo perfumado (abefg) y otra con un cebo de control sin perfume. La trampa con cebo de control da cuenta de la determinación de la atracción de la propia trampa. Además de las trampas, cada mesocosmos contenía escondites alternativos que consistían en 2-3 piezas de madera (cada una de aproximadamente 30x5,5x1 cm) y dos piezas de ropa de diferentes colores y tamaños (tamaño medio aproximado de 15x15 cm). Tanto las piezas de madera como la ropa habían sido expuestas previamente a chinches y tenían rastros de heces y sitios de agregaciones anteriores. Las piezas de madera y ropa habían sido calentadas a aprox. 50 grados o congelado durante al menos 24 horas para matar los huevos puestos por las chinches en experimentos anteriores en el mesocosmos.

Se utilizaron chinches de una cepa London Field (*Cimex lectularius* L.), alimentadas con sangre de oveja desfibrinada en todos los experimentos. Las chinches son principalmente nocturnas y controlamos el ciclo de luz (13 horas de luz entre 8:00-21:00 y 11 horas de oscuridad entre 21:00-8:00) para acercarse al de las chinches con ritmo circadiano normal. Diez chinches, cuatro hembras y seis machos, fueron liberadas simultáneamente en cada experimento. Esta proporción de sexos se utilizó en el mesocosmos porque refleja una distribución cercana a la que se encuentra en las poblaciones naturales y esperamos que promueva el comportamiento natural de las chinches.

## 5.2 Diseño del estudio

Las chinches fueron liberadas en el medio del mesocosmos, aprox. 35-40 cm tanto del control como de la trampa Nattaro Scout activa. Las dos trampas se colocaron en las esquinas diagonales separadas por aprox. 70-80 cm, con existencias de madera y prendas de vestir en el medio. Los experimentos de mesocosmos comenzaron por la tarde con trampas Nattaro Scout cargadas con geles recién abiertos. Se tomó nota del momento de la introducción y eliminación de las chinches. El número y el sexo de las chinches atrapadas tanto en el control como en las trampas activas se observaron a intervalos regulares o cuando las nuevas chinches reemplazaron a las que ya estaban en el mesocosmos.

Como una aproximación de las cantidades de volátiles emitidos por los cebos, medimos la cantidad de líquido que se evaporó de los geles durante los experimentos al pesar las trampas cargadas de gel al inicio y nuevamente cada vez que las chinches en el mesocosmos se reemplazaron por otras nuevas, y al final de cada experimento. Después de cada experimento y antes de reutilizarlas, las trampas se lavaron con un detergente sin perfume y se secaron.

Para evaluar qué tan eficaz y por cuánto tiempo fue atractivo el cebo perfumado, realizamos una prueba en la que usamos el mismo cebo durante seis días consecutivos. Durante este período, introducimos nuevas chinches en tres puntos y, al mismo tiempo, eliminamos y tomamos nota de la posición y el sexo de las chinches introducidas en el período anterior. Las trampas que contenían gel recién cargado se pesaron al inicio y nuevamente 24, 72 y 144 horas después del inicio del experimento. Se introdujeron diez chinches al mismo tiempo que se pesaron las trampas cargadas con gel y se volvieron a colocar en el mesocosmos. El primer grupo de diez chinches estuvo en el mesocosmos durante 24 horas (cebo perfumado recién abierto), el segundo grupo durante 48 horas (cebo con una antigüedad de 24 a 72 horas) y el tercer grupo durante 72 horas (cebo con una antigüedad de 72 a 144 horas).

Al evaluar la eficacia del cebo en relación con su edad, notamos que las chinches hembras y machos fueron capturadas a diferentes ritmos. Usinger (1966) informó que, en condiciones óptimas, las chinches adultas, así como las ninfas, comienzan a buscar comida aproximadamente una semana después de su comida de sangre anterior y después de alimentarse, las ninfas comienzan a desarrollarse a su siguiente etapa. Sin embargo, para evitar complicaciones sustanciales, no incluimos ninfas en el presente estudio. Las chinches usadas en los experimentos que se alimentaron menos de 7 días antes del experimento se consideraron saciadas o alimentadas, de lo contrario se marcaron como no alimentadas. Esta división se usará al buscar diferencias en el comportamiento.

### 5.3. Resultados

La Tabla 9 muestra la distribución de chinches en relación con la antigüedad/longitud de los cebos.

- 5 No hubo diferencias significativas relacionadas con la antigüedad de los cebos (0-24, 24-72, 72-144 horas) en la distribución de las chinches en trampas activas, trampas de control y fuera del mesocosmos. Las trampas activas capturaron un número mayor estadísticamente significativo de chinches en comparación con las trampas de control (diferencia perfume-control 0,321,  $p < 0,001$  \*\*\*) y se encontró un mayor número estadísticamente significativo de chinches fuera del mesocosmos que en cualquier tipo de trampa (diferencia exterior-control 0,400,  $p < 0,001$  \*\*\* y la
- 10 diferencia de exterior-perfume 0,079,  $p=0,02$  \*)

Tabla 9. Distribución de chinches en relación con la longitud/antigüedad del cebo

| Período/media $\pm$ DE | Trampa perfumada             | Trampa de control            | Trampas exteriores           |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1: 0 (24h)             | 3,71 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup> | 0,88 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup> | 5,42 $\pm$ 3,71 <sup>c</sup> |
| 2: (24- 72 h)          | 3,75 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup> | 1,35 $\pm$ 1,71 <sup>b</sup> | 4,90 $\pm$ 3,12 <sup>c</sup> |
| 3: (72- 144 h)         | 3,67 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup> | 1,21 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup> | 5,13 $\pm$ 2,86 <sup>c</sup> |

<sup>abc</sup>Prueba Tukey HSD a posteriori para ANOVA de 2 vías de distribución de chinches en relación con la antigüedad del cebo. Las diferentes letras en cada período indican una diferencia estadísticamente significativa entre las posiciones de las chinches al final de ese período

- 15 Así, la Tabla 9 muestra que las trampas perfumadas, es decir, las trampas que contienen la composición según la invención, atraparon significativamente más chinches que las trampas de control. No todas las chinches quedaron atrapadas: la mayoría de las chinches permanecieron fuera en el mesocosmos.

Como se muestra en la tabla 8, la composición según el primer aspecto de la presente invención es eficaz también

20 cuando se usa junto con una trampa.

La Tabla 9 muestra la distribución total de las chinches, es decir, no especifica la proporción de machos y hembras que se encontraron en las trampas.

- 25 Como se especificó anteriormente, se utilizaron 6 machos y 4 hembras para cada experimento. La Tabla 10 muestra las capturas de chinches hembras y machos en mesocosmos durante 0-24, 24-72 y 72-144 horas. La presencia de chinches y su sexo se puntuaron en tres posiciones diferentes: en trampas Nattaro Scout con cebo perfumado, en trampas Nattaro Scout con cebo sin perfume (control) y en el mesocosmos fuera de las trampas.

30 Tabla 10. Distribución de chinches en relación con la longitud/antigüedad del cebo

| Período/media $\pm$ DE | sexo    | trampa perfumada | trampa de control | trampas exteriores | N  |
|------------------------|---------|------------------|-------------------|--------------------|----|
| <u>0-24</u>            | hembras | 1,71 $\pm$ 1,52  | 0,54 $\pm$ 0,88   | 1,75 $\pm$ 1,70    | 24 |
| <u>0-24</u>            | machos  | 2,00 $\pm$ 1,89  | 0,33 $\pm$ 0,64   | 3,67 $\pm$ 2,16    | 24 |
| <u>24-72</u>           | hembras | 1,83 $\pm$ 1,28  | 0,75 $\pm$ 1,00   | 1,42 $\pm$ 1,41    | 48 |
| <u>24-72</u>           | machos  | 1,92 $\pm$ 1,60  | 0,60 $\pm$ 0,94   | 3,48 $\pm$ 2,05    | 48 |
| <u>72-144</u>          | hembras | 1,58 $\pm$ 1,25  | 0,6 $\pm$ 0,92    | 1,81 $\pm$ 1,27    | 48 |
| <u>72-144</u>          | machos  | 2,08 $\pm$ 1,64  | 0,60 $\pm$ 1,27   | 3,31 $\pm$ 1,94    | 48 |

Cuando se dividen por sexo, las chinches, tanto hembras como machos, son significativamente más propensas a quedar atrapadas en las trampas Nattaro Scout perfumadas en comparación con las trampas de control en los tres

35 grupos de antigüedad.

En consecuencia, la composición según el primer aspecto de la presente invención es eficaz para atraer tanto a chinches hembras como machos. Esto es importante ya que aumenta la posibilidad de atraer una chinche, ya sea macho o hembra, y por lo tanto permite la detección de la presencia de chinches, independientemente del sexo.

40

Para evaluar el efecto del estado alimentada/no alimentada de las chinches, las posiciones al final de cada experimento se compararon para las chinches machos y hembras alimentadas y no alimentadas y se presentan en las tablas 11-

13 a continuación:

Tabla 11. Comparación entre la media y la desviación estándar de las posiciones al final de cada experimento con un nuevo perfume para las chinches hembras y machos alimentadas y no alimentadas, donde  $N_{\text{Alimentada}}=32$  y

5

$N_{\text{NoAlimentada}}=16$  para ambos sexos

| Posición | Sexo   | Chinches alimentadas/no alimentadas | Media (proporción) | Desv. est. |
|----------|--------|-------------------------------------|--------------------|------------|
| Control  | Hembra | No alimentada                       | 0,688 (17,2 %)     | 0,946      |
| Control  | Hembra | Alimentada                          | 0,719 (18,0 %)     | 0,958      |
| Exterior | Hembra | No alimentada                       | 1,188 (29,7 %)     | 1,601      |
| Exterior | Hembra | Alimentada                          | 1,563 (39,1 %)     | 1,294      |
| Perfume  | Hembra | No alimentada                       | 2,125 (53,1 %)     | 1,544      |
| Perfume  | Hembra | Alimentada                          | 1,750 (43,8 %)     | 1,270      |
| Control  | Macho  | No alimentada                       | 0,500 (8,3 %)      | 0,730      |
| Control  | Macho  | Alimentada                          | 0,313 (5,2 %)      | 0,592      |
| Exterior | Macho  | No alimentada                       | 2,875 (47,9 %)     | 2,156      |
| Exterior | Macho  | Alimentada                          | 3,094 (51,6 %)     | 1,907      |
| Perfume  | Macho  | No alimentada                       | 2,625 (43,8 %)     | 1,928      |
| Perfume  | Macho  | Alimentada                          | 2,594 (43,2 %)     | 1,739      |

Tabla 12. Comparación entre la media y la desviación estándar de las posiciones al final de cada experimento con un perfume de 1 día de antigüedad para las chinches hembras y machos alimentadas y no alimentadas, donde

10

$N_{\text{Alimentada}}=16$  y  $N_{\text{NoAlimentada}}=32$  para ambos sexos

| Posición | Sexo   | Chinches alimentadas/no alimentadas | Media (proporción) | Desv. est. |
|----------|--------|-------------------------------------|--------------------|------------|
| Control  | Hembra | No alimentada                       | 0,813 (20,3 %)     | 1,091      |
| Control  | Hembra | Alimentada                          | 0,625 (15,6 %)     | 0,806      |
| Exterior | Hembra | No alimentada                       | 1,188 (29,7 %)     | 1,401      |
| Exterior | Hembra | Alimentada                          | 1,875 (46,9 %)     | 1,360      |
| Perfume  | Hembra | No alimentada                       | 2,000 (50,0 %)     | 1,344      |
| Perfume  | Hembra | Alimentada                          | 1,500 (37,5 %)     | 1,095      |
| Control  | Macho  | No alimentada                       | 0,813 (13,6 %)     | 1,061      |
| Control  | Macho  | Alimentada                          | 0,188 (3,1 %)      | 0,403      |
| Exterior | Macho  | No alimentada                       | 2,688 (44,8 %)     | 2,039      |
| Exterior | Macho  | Alimentada                          | 5,063 (84,4 %)     | 0,772      |
| Perfume  | Macho  | No alimentada                       | 2,500 (41,7 %)     | 1,586      |
| Perfume  | Macho  | Alimentada                          | 0,750 (12,5 %)     | 0,775      |

Tabla 13. Comparación entre la media y la desviación estándar de las posiciones al final de cada experimento con un perfume de 3 días de antigüedad para las chinches hembras y machos alimentadas y no alimentadas, donde

$N_{\text{Alimentada}}=16$  y  $N_{\text{NoAlimentada}}=32$  para ambos sexos

| Posición | Sexo   | Chinches alimentadas/no alimentadas | Media (proporción) | Desv. est. |
|----------|--------|-------------------------------------|--------------------|------------|
| Control  | Hembra | No alimentada                       | 0,656 (16,4 %)     | 1,035      |
| Control  | Hembra | Alimentada                          | 0,500 (12,5 %)     | 0,632      |
| Exterior | Hembra | No alimentada                       | 1,531 (38,3 %)     | 1,218      |
| Exterior | Hembra | Alimentada                          | 2,375 (59,4 %)     | 1,204      |
| Perfume  | Hembra | No alimentada                       | 1,813 (45,3 %)     | 1,256      |
| Perfume  | Hembra | Alimentada                          | 1,125 (28,1 %)     | 1,147      |

| Posición | Sexo  | Chinches alimentadas/no alimentadas | Media (proporción) | Desv. est. |
|----------|-------|-------------------------------------|--------------------|------------|
| Control  | Macho | No alimentada                       | 0,906 (15,1 %)     | 1,467      |
| Control  | Macho | Alimentada                          | 0,000 (0,0 %)      | 0,000      |
| Exterior | Macho | No alimentada                       | 2,688 (44,8 %)     | 1,857      |
| Exterior | Macho | Alimentada                          | 4,563 (76,1 %)     | 1,459      |
| Perfume  | Macho | No alimentada                       | 2,406 (40,1 %)     | 1,643      |
| Perfume  | Macho | Alimentada                          | 1,438 (24,0 %)     | 1,459      |

En los experimentos con la composición abefg (perfume) no hubo efectos agregados si las chinches hembras o machos fueron alimentadas o no sobre el efecto ya establecido del Nattaro Scout perfumado. En consecuencia, la composición según el primer aspecto de la presente invención es eficaz para atraer tanto a chinches no alimentadas como alimentadas. Esto es importante ya que permite el uso de la composición para la detección de chinches también en lugares donde la fuente de alimento, es decir, los humanos, se han mudado. Por lo tanto, la composición se puede usar para detectar cualquier chinche restante después de un esfuerzo de exterminio, por ejemplo, cuando un local o habitación/apartamento/casa haya estado deshabitado por algún tiempo mientras el esfuerzo de exterminio se desarrollaba. En ese caso, las chinches restantes probablemente no habrán tenido la oportunidad de alimentarse durante varios días y, en consecuencia, es importante que la composición sea capaz de atraer tanto a las chinches alimentadas como a las no alimentadas.

Aunque no hay un resultado significativo, cuando se revisan las proporciones medias del nuevo perfume, las hembras no alimentadas son el grupo con mayor probabilidad de quedar atrapado tanto en la trampa activa de Nattaro Scout como en la trampa de control, ya que las proporciones medias eran hembras alimentadas-perfume =43,8 %, no alimentadas-perfume =53,1 %, machos alimentados-perfume =43,2 %, machos no alimentados-perfume =43,8 %, hembras alimentadas-control =18,0 %, hembras no alimentadas-control =17,2 %, machos alimentados-control =5,2 % y machos no alimentados-control =8,3 % (Tabla 11). Estos resultados también se encuentran tanto en el perfume con un 1 día de antigüedad como en los experimentos de perfume con 3 días de antigüedad fueron proporciones medias para Nattaro Scout activo con 1 día de antigüedad, eran hembras alimentadas-perfume =37,5 %, hembras no alimentadas-perfume =50,0 %, machos alimentados-perfume =12,5 %, machos no alimentados-perfume =41,7 %, hembras alimentadas-control =15,6 %, hembras no alimentadas-control =20,3 %, machos alimentados-control =3,1 % y machos no alimentados-control =13,6 % (Tabla 12) y las proporciones medias para Nattaro Scout activo con 3 días de antigüedad fueron hembras alimentadas-perfume =28,1 %, hembras no alimentadas-perfume =45,3 %, machos alimentados-perfume =24,0 %, machos no alimentados-perfume =40,1 %, hembras alimentadas-control =12,5 %, hembras no alimentadas-control =16,4 %, machos alimentados-control =0,0 % y machos no alimentados-control =15,1 % (Tabla 13).

Sin embargo, se debe dar cierta consideración a los efectos de las chinches alimentadas y no alimentadas ya que a las chinches solo se les ofreció o no se les ofreció la oportunidad de alimentarse dentro de 7 días, no todas las chinches se alimentaron en esta oportunidad. Por lo tanto, estos resultados deben tomarse como resultados preliminares.

La tasa a la que se encontró al menos 1 chinche en la trampa, para la trampa Nattaro Scout activa con nuevo perfume fue de 89,58%  $\pm$  4,41 comparado con 54,17 %  $\pm$  7,19 para el control, la tasa de aciertos en el perfume con 1 día de antigüedad fue de 91,67 %  $\pm$  3,99 en comparación con el control a 56,25 %  $\pm$  7,16 y para el perfume con una antigüedad de 3 días la tasa de acierto fue de 91,67 %  $\pm$  3,99 en comparación con el control 47,92 %  $\pm$  7,21, véase la tabla 14 a continuación:

Tabla 14. Antigüedad del perfume, tasa de aciertos media  $\pm$  desviación estándar, la tasa a la que se encontró al menos una de las diez chinches en cada trampa. La tasa de aciertos se calcula:  $\frac{\text{NAI menos una chinche encontrada en trampa con perfume/control}}{\text{N}}$ . La tasa de aciertos no debe interpretarse sola, sino compararse entre trampas activas y trampas de control. La tasa de hembras/machos en el mesocosmos fue 4:6, N=48.

| Posición                        | Antigüedad del perfume (días) | Tasa de aciertos | Desv. est. |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------|------------|
| Trampa Scout Nattaro activa     | 0                             | 89,58 %          | 4,41 %     |
| Trampa Scout Nattaro de control | 0                             | 54,17 %          | 7,19 %     |
| Trampa Scout Nattaro activa     | 1                             | 91,67 %          | 3,99 %     |
| Trampa Scout Nattaro de control | 1                             | 56,25 %          | 7,16 %     |
| Trampa Scout Nattaro activa     | 3                             | 91,67 %          | 3,99 %     |
| Trampa Scout Nattaro de control | 3                             | 47,92 %          | 7,21 %     |

La Tabla 14 muestra que, para todas las antigüedades del perfume, la tasa de aciertos fue significativamente mayor para las trampas con la composición abefg que para las trampas de control.

#### 5 5.4 Resumen

A modo de resumen del Ejemplo 4, debe observarse que la trampa Nattaro Scout cebada con la composición perfumada abefg según el primer aspecto de la presente invención (1:1:1:1:1, conc. 100 mg/l, es decir,  $10^{-4}$  de cada compuesto) atrae tanto a las chinches hembras como machos significativamente más que una trampa de control

- 10 Nattaro Scout en las pruebas de mesocosmos. Solo una vez, según les consta a los inventores, una mezcla de perfume sintético fue capaz de atraer chinches en un estudio controlado de mesocosmos (solicitud de patente de los Estados Unidos 15/10.676 de Gries y col.), en ese caso mediante el uso de chinches machos y mezclas de perfume recién mezcladas. Nuestros resultados muestran resultados muy significativos de que la mezcla de gelatina perfumada atrajo
- 15 72 horas como en el grupo de perfume con una antigüedad de 72 a 144 horas mejor que la trampa de control que contenía solo gelatina.

Como hay 48 réplicas de mesocosmos en los tres grupos de antigüedad del perfume con 10 chinches en cada configuración (proporción hembra/macho 6:4), los resultados deben considerarse una prueba muy fuerte de que la

- 20 mezcla de gel perfumado funciona para atraer chinches a la trampa Nattaro Scout en una configuración de mesocosmos controlada.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para atraer chinches, donde la composición comprende (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona.
- 5 2. La composición según la reivindicación 1, donde la composición comprende 1 parte de (E)-2-hexenal, 2 a 5 partes de ácido (E)-2-hexenoico, 1 parte de (E)-2-octenal, 1 a 10 partes de ácido 2-octenoico y 1 parte de 2-hexanona.
- 10 3. La composición según la reivindicación anterior, donde la composición no comprende ningún otro componente volátil aparte de (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona.
4. La composición según cualquier reivindicación anterior, donde la composición comprende, además, un vehículo.
- 15 5. La composición según la reivindicación 4, donde el vehículo se selecciona del grupo que consiste en gelatina, polietilenglicol (PEG), polímero superabsorbente, tal como poliacrilato de sodio, aceite mineral, parafina y agua.
- 20 6. La composición según la reivindicación 5, donde el vehículo comprende PEG 4000.
7. La composición según cualquier reivindicación anterior, donde la composición comprende 100-300 mg/l de (E)-2-hexenal, 100-1500 mg/l de ácido (E)-2-hexenoico, 100-300 mg/l de (E)-2-octenal, 100-3000 mg/l de ácido 2-octenoico y 100-300 mg/l de 2-hexanona, basada en el volumen total de la composición.
- 25 8. La composición según cualquier reivindicación anterior, donde una dosis de la composición comprende 0,1 a 100 g, tal como 0,5 a 10 g, tal como 0,5 a 3,5 g de la composición, o alternatively, una dosis de la composición comprende 0,1 a 100 ml, tal como 0,5 a 10 ml, tal como 0,5 a 3,5 ml de la composición.
- 30 9. La composición según cualquier reivindicación anterior, donde los volátiles emitidos por la composición a una temperatura de 20 °C y a una presión atmosférica estándar de 101,3 kPa, comprenden 0,001 a 37,4 % de (E)-2-hexenal, 0,01 a 2,2 % de ácido (E)-2-hexenoico, 40,4 a 90,9 % de (E)-2-octenal, 0,001 a 2,8 % de ácido 2-octenoico y 5,9 a 39,8 % de 2-hexanona, donde la suma de los porcentajes es menor o igual a 100 %.
- 35 10. La composición según cualquier reivindicación anterior, que comprende, además, un insecticida.
11. Una trampa para atrapar chinches, donde la trampa comprende o contiene (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona, preferentemente como la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 12. Un procedimiento para atraer chinches, que comprende la etapa de: i) colocar (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona en un lugar donde hay chinches presentes.
13. El procedimiento según la reivindicación 12, donde (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona se proporcionan como la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o como la trampa según la reivindicación 11.
- 45 14. Un procedimiento para detectar chinches, que comprende la etapa de i) colocar (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona, en un lugar donde se sospecha que hay chinches presentes.
- 50 15. El procedimiento según la reivindicación 14, donde (E)-2-hexenal, ácido (E)-2-hexenoico, (E)-2-octenal, ácido 2-octenoico y 2-hexanona se proporcionan como la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o como la trampa según la reivindicación 11.