

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 463**

51 Int. Cl.:

A01M 1/20 (2006.01)
A01M 1/02 (2006.01)
A01N 25/34 (2006.01)
A01N 43/54 (2006.01)
A01P 7/04 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2008 E 08711322 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2111755**

54 Título: **Control de plagas usando lisozima, sal o un fragmento biológico de la misma o un péptido relacionado con lisozima como feromona de reconocimiento del huevo**

30 Prioridad:

15.02.2007 JP 2007035030

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

23.09.2015

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
OKAYAMA UNIVERSITY (100.0%)
1-1, Tsushima-Naka 1-chome Kita-ku
Okayama-shi, Okayama 700-8530, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUURA, KENJI;
TAMURA, TAKASHI y
KOBAYASHI, NORIMASA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 546 463 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

Control de plagas usando lizozima, sal o un fragmento biológico de la misma o un péptido relacionado con lizozima como feromona de reconocimiento del huevo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo huevo mimético que comprende lizozima aislada o una sal de la misma como feromona de reconocimiento del huevo y una sustancia que lleva a cabo la exterminación o la prevención de las termitas en su material base que imita un huevo de una termita, a un método para la exterminación y prevención de las termitas usando los mismos.

10

Técnica anterior

Para la exterminación de animales dañinos, se han desarrollado diversos métodos hasta el momento. En particular, las termitas causan un daño enorme a las casas de madera, y por lo tanto, se han investigado y desarrollado agentes de exterminación y métodos de exterminación de animales dañinos en el mundo. Los métodos para exterminar termitas incluyen un método para inyectar un agente en solución tal como un agente organofosforado, un agente carbamato o un agente piretroide en los lugares invadidos para destruir a los insectos, o un método para realizar la fumigación con bromuro de metilo o similar para destruir a los insectos (véase, por ejemplo, "Termites and strategies of extermination", The Japan Termite Control Association, 2000, página 219).

15

20

Como una alternativa al método de pulverización de un agente, existe un método de cebo en el cual se mezcla un ingrediente activo insecticida de acción lenta en un cebo y se alimenta a las termitas con el cebo y de este modo se extermina a las termitas (véase, por ejemplo, "Activity evaluation of Japanese underground termites using a monitoring station and the extermination by bait methods", New developments of monitoring technique of insect ecology in a living zone, 2006, página 48).

25

Las técnicas convencionales de exterminación de termitas son básicamente esparcir una gran cantidad de un agente en la parte exterior de la madera dañada para destruir al insecto. Sin embargo estas técnicas conducen a daños en la salud tales como el síndrome del edificio enfermo o a contaminación ambiental. Además, existe un problema de que si algunas de las colonias de termitas persisten, esto hace que el daño se propague a otros sitios. El problema más serio es que el coste salarial necesario para la exterminación es demasiado elevado. Con frecuencia se han llevado a cabo técnicas de fumigación que usan bromuro de metilo, sin embargo el bromuro de metilo es una sustancia que causa la destrucción de la capa de ozono, y en los últimos años, hay una tendencia creciente para regular el uso del bromuro de metilo.

30

35

Como un método eficaz para exterminar a las hormigas que organizan una vida social del mismo modo que las termitas, existe un método para mezclar un alimento favorito de las hormigas con un veneno y proporcionar el alimento mezclado como un cebo para permitir que las hormigas lleven el alimento a sus hormigueros y destruir a la población completa de hormigas. Sin embargo, debido a que las termitas se alimentan de la propia madera con la que construyen el termitero, el método de cebo para permitir que las termitas transfieran un agente desde el exterior del termitero al interior del mismo usando un cebo envenenado no siempre es eficaz. En particular, es difícil erradicar el termitero de *Reticulitermes speratus* mediante el método de cebo (véase, "Activity evaluation of Japanese underground termites using a monitoring station and the extermination by bait methods", New developments of monitoring technique of insect ecology in a living zone, 2006, página 48).

40

45

Como un método para hacer que los animales dañinos ingieran los ingredientes activos más eficazmente que con el método de cebo, se ha desarrollado un "método para exterminar animales dañinos por transferencia de huevos miméticos" (documento JP 2000-342149 A) en el que se utiliza el instinto de transferir los huevos que es una conducta social básica de los animales dañinos. Los animales dañinos de este método fueron termitas. Sin embargo, en este método, ha sido posible hacer que las termitas transfieran huevos miméticos usando ingredientes sin procesar extraídos de los huevos de termita, sin embargo, no se ha identificado la feromona de reconocimiento del huevo. A menos que se identifique la feromona de reconocimiento del huevo y que pueda producirse a gran escala y de modo asequible, sigue habiendo un gran problema de costes para llevar a cabo dicho método.

50

55

En particular, si los animales dañinos son termitas, la exterminación es difícil por las razones anteriormente descritas y aún no se ha encontrado una solución concluyente.

Dado que las termitas tienen su hábitat en un espacio cerrado, en una madera, es difícil infiltrar un agente desde el exterior.

60

Dado que las termitas tienen una vida socialmente organizada, si persisten algunas colonias, las termitas se desplazan y hacen que el daño se extienda.

65

Dado que las termitas viven ingiriendo la madera en la que constituyen su hábitat en sí mismo, la introducción de un cebo envenenado no es eficaz.

Divulgación de la invención

5

Problemas a resolver por la invención

Concibiendo las circunstancias anteriores, los autores de la presente invención han estudiado exhaustivamente identificar la feromona de reconocimiento del huevo de los animales dañinos, en particular, las termitas, con el fin de hacer que el método para exterminar termitas que usa la transferencia de huevos miméticos sea más eficaz y de proporcionarlo más económicamente. Los autores de la presente invención han descubierto que la feromona de reconocimiento del huevo de las termitas es lisozima, que es un tipo de proteína antibacteriana, y que las termitas reconocen huevos que comprenden lisozima, y transfieren y protegen los huevos en una cámara de crecimiento del termitero. Por lo tanto, los autores de la presente invención han completado la misma.

15

Medios para resolver los problemas

En otras palabras, la presente invención se refiere a un huevo mimético de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 adjuntas, a un método para exterminar termitas de acuerdo con la reivindicación 4 adjunta y a un uso de lisozima o una sal de la misma de acuerdo con la reivindicación 5 adjunta.

20

Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, puede producirse, a gran escala y de manera asequible, un huevo mimético que comprende una lisozima aislada o una sal de la misma, como una feromona de reconocimiento del huevo y una sustancia que lleva a cabo la exterminación o prevención de las termitas en su material base imitando a un huevo de una termita. Y la exterminación o prevención de las termitas puede llevarse a cabo eficazmente, de un modo sencillo y económico.

25

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un resultado de la investigación de la actividad del reconocimiento del huevo de lisozima por las termitas. Las abreviaturas se indican del siguiente modo; EHT: extracto de huevo de termita, pK: extracto de huevo de termita degradado por proteinasa, LHT: lisozima aislada del extracto de huevo de termita, LCH: lisozima de clara de huevo, CEL: celulasa, LCH+CEL: solución mixta de lisozima de clara de huevo y celulasa. n.s.: no hay diferencias significativas con respecto al control. **: hay una diferencia significativa con un nivel de significación del 1 %. ***: hay una diferencia significativa con un nivel de significación del 0,1 % (ensayo T bilateral).

35

La Fig. 2 muestra fotografías que muestran la situación de transferencia de huevos miméticos a una masa de huevos en el caso en el que a las termitas se las proporciona huevos miméticos recubiertos con un extracto de huevo de termita (izquierda). Se adjuntan círculos blancos a los huevos miméticos con el fin de aclarar los huevos miméticos que se han transportado (derecha).

40

Mejor modo para llevar a cabo la invención

45

Los insectos, tales como las termitas que tienen una característica de transferir huevos, tienen características de cuidar de los huevos transfiriéndolos y apilándolos en su termitero y lamiendo la superficie de los huevos, o realizando la trofalaxis entre individuos. Utilizando dichas características, la termita puede exterminarse o prevenirse. Por ejemplo, las termitas reconocen huevos miméticos que tienen un tamaño y una forma similar a la de los huevos naturales, y que comprenden la feromona de reconocimiento del huevo sobre la superficie del mismo, como en los huevos naturales, y transfieren los huevos miméticos a su masa de huevos en el termitero. En consecuencia, las termitas realizan conductas de cuidado tales como lamer la superficie del huevo mimético y realizar la trofalaxis entre individuos. Por consiguiente, el centro reproductivo de las colonias puede destruirse eficazmente haciendo que los huevos miméticos comprendan una sustancia activa, por ejemplo, un ingrediente activo tal como un ingrediente insecticida, una sustancia inhibidora de la eclosión, una sustancia inhibidora de la reproducción o un ingrediente inhibidor del crecimiento y hacer que las termitas transfieran los huevos miméticos a la masa de huevos.

50

55

Los autores de la presente invención han estudiado exhaustivamente repetidas veces para identificar la feromona de reconocimiento del huevo de las termitas. La feromona de reconocimiento del huevo que se purifica y se aísla mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba se ha sometido a un análisis preciso de la masa, y este ha revelado que la feromona de reconocimiento del huevo es una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 14,5 kDa. Además, dado que el ingrediente activo mostró una actividad bacteriolítica alta, se sugirió que la feromona de reconocimiento del huevo de las termitas es lisozima, que es un tipo de proteína antibacteriana. Basándose en los hallazgos, se ha determinado la actividad de reconocimiento del huevo de las termitas para las muestras de una lisozima procedente de la clara de huevo de gallina y se ha reconocido una actividad alta. Por consiguiente, se ha revelado que la feromona de reconocimiento del huevo de las termitas es

60

65

lisozima.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un huevo mimético que comprende una lisozima aislada o una sal de la misma como una feromona de reconocimiento del huevo y una sustancia que puede llevar a cabo la exterminación o la prevención de las termitas en su material base que imita un huevo de una termita.

Las termitas que pueden exterminarse a través de huevos miméticos y el método de la presente invención, tienen un instinto de transferencia del huevo y reconocen una lisozima como la feromona de reconocimiento del huevo. Las termitas exterminadas por la presente invención pueden ser cualquier tipo de termitas, y puede dirigirse no solamente a las termitas de Japón sino también a las del resto del mundo. Las termitas típicas que se exterminan a través de la presente invención incluyen termitas tales como *Reticulitermes* y *Coptotermes*, pero no se limitan a las mismas. En la presente memoria descriptiva, la exterminación de las termitas incluye la prevención de las termitas. En la presente memoria descriptiva, las termitas son insectos que causan efectos nocivos a seres humanos, animales de granja, productos agropecuarios, recursos.

La feromona de reconocimiento del huevo de la presente invención es una lisozima aislada o una sal de la misma. La lisozima puede aislarse, por ejemplo, de muchas especies de organismos, por ejemplo, puede aislarse de mamíferos, de especies avícolas, tales como pollo, de peces, de reptiles, de anfibios, de insectos tales como gusanos de seda. La lisozima preferente que puede obtenerse a gran escala y de modo asequible, y puede usarse en la presente invención, incluye lisozima aislada de clara de huevo de gallina. Además, la lisozima aislada del extracto de huevo de termita puede usarse en la presente invención. La lisozima usada en la presente invención puede purificarse o no. Además, la lisozima usada en la presente invención puede producirse mediante un método de recombinación genética. La producción de la proteína, polipéptido o péptido mediante un método de recombinación genética es bien conocida por los expertos en la materia. En general, el gen de una proteína deseada se conecta con un vector y se introduce en una célula hospedadora apropiada tal como *Escherichia coli* o levadura, y mediante la proliferación de la célula, puede obtenerse la proteína deseada. El tipo de vector o de la célula hospedadora, una condición de introducción de un vector, la condición de cultivo de la célula hospedadora, un método para separar y purificar la proteína deseada pueden seleccionarse apropiadamente de materiales conocidos y de métodos conocidos por los expertos en la materia.

La lisozima usada en la presente invención puede estar en una forma de una sal. La sal de lisozima puede ser una sal con todas las sustancias que pueda formar una sal, por ejemplo, una sal con un ácido orgánico, una sal con un ácido inorgánico, una sal con una base orgánica, o una sal con una base inorgánica. Además, por ejemplo, el grupo β - o γ -carboxilo de la asparagina o glutamina que constituyen la lisozima y un metal tal como sodio o potasio pueden formar una sal. Además, por ejemplo, puede formarse una sal con una cadena lateral de un aminoácido básico que constituye la lisozima. También se divulga que un fragmento biológico de lisozima o un péptido relacionado con lisozima puede tener una forma de una sal.

Además, se divulga un fragmento biológico de lisozima como una feromona de reconocimiento del huevo. El fragmento biológico de lisozima es un polipéptido o un péptido que tiene una secuencia parcial de aminoácidos de lisozima y que tiene una actividad de reconocimiento del huevo similar a la lisozima. El fragmento es una cadena corta, y por lo tanto, es adecuado para la producción a gran escala mediante un método de recombinación genética.

Además, se divulga un péptido relacionado con lisozima como una feromona de reconocimiento del huevo. El péptido relacionado con lisozima es una proteína, un polipéptido o un péptido que tiene una actividad de reconocimiento del huevo similar a la lisozima y que es distinto de la lisozima y el fragmento biológico de lisozima. El péptido relacionado con lisozima puede proceder de una fuente natural o puede ser un compuesto sintético. El péptido relacionado con lisozima puede tener una secuencia de aminoácidos distinta de la lisozima natural mediante una técnica tal como el método de mutagénesis dirigida. Por ejemplo, puede producirse y usarse una lisozima, o fragmento biológico de la misma o un péptido relacionado con lisozima que tenga una secuencia de aminoácidos que esté más favorecida por las termitas. Además, puede producirse y usarse, por ejemplo, una lisozima, o fragmento biológico de la misma o un péptido relacionado con lisozima que tiene una secuencia de aminoácidos que tenga una alta especificidad para las termitas de un tipo específico.

Es necesario que los huevos miméticos de la presente invención tengan formas, tamaños y características análogas a las formas, tamaños y características de los huevos de las termitas a exterminar. La forma y el tamaño de los huevos miméticos usados en la presente invención pueden producirse imitando la forma y el tamaño de los huevos reales de las termitas. La forma de los huevos miméticos puede ser una forma de huevo alargado o una forma esférica. En el caso del huevo mimético que tiene una forma de huevo alargado, es preferible que su diámetro corto sea aproximadamente el mismo o ligeramente mayor que el diámetro corto de los huevos de las termitas a exterminar. Por ejemplo, cuando el diámetro corto del huevo de termita de forma alargada es de 0,25 a 0,45 milímetros, el diámetro corto del huevo mimético de termitas de forma alargada puede ser de 0,25 a 0,6 milímetros, preferentemente, de 0,4 a 0,55 milímetros, y más preferentemente, de 0,45 milímetros. Además, en el caso de los huevos miméticos de termitas de forma esférica, es preferible que su diámetro sea aproximadamente el mismo que o ligeramente mayor que el diámetro corto de los huevos de las termitas a exterminar. Por ejemplo, cuando el diámetro corto del huevo de termita esférico es de 0,25 a 0,45 milímetros, el diámetro corto del huevo mimético de termitas

esférico puede ser de 0,25 a 0,6 milímetros, preferentemente, de 0,4 a 0,6 milímetros, y más preferentemente, de 0,4 a 0,55 milímetros. Desde el punto de vista de la facilidad de formación, es preferible la forma esférica del huevo mimético.

5 No solamente es necesario que las propiedades físicas tales como la forma y el tamaño como se describe anteriormente y el peso o la dureza sino también las propiedades químicas, en particular, la feromona de reconocimiento del huevo mimético de la presente invención sean las mismas o similares a las del huevo natural de las termitas. Es decir, es necesario que cuando el material base del huevo mimético comprenda lisozima, esta sustancia aparezca en la superficie del material base.

10 El material base del huevo mimético de la presente invención puede ser cualquier material que pueda producir el huevo mimético que tiene una forma y características similares a las del huevo natural de las termitas. El material base preferente para la producción del huevo mimético de la presente invención incluye resinas termoplásticas tales como polietileno, polipropileno, poliestireno, poliéster, cloruro de polivinilo y policarbonato, resinas termoestables
15 tales como las resinas de urea, resinas epoxi, resinas fenólicas y poliuretano, materiales porosos tales como gel de sílice y zeolita, cerámica, vidrio.

El material base comprende lisozima aislada o una sal de la misma y una sustancia que lleva a cabo la exterminación o prevención de las termitas en su material base imitando un huevo de una termita, y por lo tanto, se produce el huevo mimético de la presente invención. Un experto en la materia conoce muchos métodos para fabricar estas sustancias comprendidas en el material base. En la producción del material base, estas sustancias pueden mezclarse en el mismo, o después de producir el material base, estas sustancias pueden estar comprendidas en el material base. Por ejemplo, en la producción del material base, estas sustancias pueden mezclarse o amasarse en el mismo, o el material base producido puede cubrirse, sumergirse, recubrirse con, o se pueden extender con estas
20 sustancias. Además, dado que se conocen métodos para inmovilizar una proteína, un polipéptido o un péptido en un soporte sólido, estos métodos pueden aplicarse a estos. El método de inmovilización incluye un método de adsorción, un método de enlace covalente, un método de enlace iónico, un método de encapsulación.

La cantidad de lisozima aislada o una sal de la misma aplicada al material base del huevo mimético de la presente invención puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia dependiendo de diversos factores, tales como la especie (organismo originario), propiedades fisicoquímicas o similares, tipos de termitas, un tipo o cantidad de la sustancia activa y un tipo o grado del efecto deseado (véanse, por ejemplo, los Ejemplos de la presente solicitud).

35 Las realizaciones preferentemente específicas del modo de fabricación del material base para que comprenda lisozima aislada o una sal de la misma y un ingrediente activo incluyen un modo de recubrimiento de superficie, un modo de adición del material base, un modo de disolución de la cápsula. En un ejemplo del modo de recubrimiento de la superficie, la superficie de un material base se recubre con un ingrediente activo y una lisozima aislada o una sal de la misma queda recubriendo la misma. En un ejemplo del modo de adición del material base, se recubre la superficie de un material base con una lisozima aislada o una sal de la misma mezclada con un ingrediente activo. En un ejemplo del modo de disolución de la cápsula, se forma un material base con forma de película en un material base con forma de cápsula y se sella un ingrediente activo en el mismo, y se recubre la superficie del material base con la lisozima aislada o una sal de la misma.

45 La sustancia activa que se usa junto con la lisozima aislada o una sal de la misma para el huevo mimético y el método de exterminación de la presente invención es cualquier sustancia que pueda llevar a cabo la exterminación o la prevención de las termitas. Por ejemplo, la sustancia activa puede desorganizar la conducta de las termitas y de ese modo conducir a la destrucción de la colonia. La sustancia activa adecuada para la exterminación o prevención de las termitas incluye un ingrediente insecticida, una sustancia inhibidora de la eclosión, una sustancia inhibidora de la reproducción o un ingrediente inhibidor del crecimiento. Un tipo y una cantidad de la sustancia activa que puede usarse para el huevo mimético y el método de la presente invención puede seleccionarse considerando diversos factores tales como el tipo de la sustancia activa o el tipo de la termita y el tipo o el grado de la actividad deseada (daño que se le hará a la termita). En general, el tipo y la cantidad de la sustancia activa se seleccionan de modo que pueda ejercerse el efecto deseado suficientemente a la termita diana. Sin embargo, la selección también se efectúa de modo que la tasa de transferencia del huevo mimético de las termitas no disminuya y de modo que no afecte adversamente a los seres humanos y a animales de granja circunyacentes o de que no se produzcan insectos
50 beneficiosos mediante el uso de los huevos miméticos y el método de la presente invención.

Un tipo, o dos o más, del ingrediente activo pueden usarse para los huevos miméticos y el método de exterminación de la presente invención. Pueden usarse ingredientes insecticidas tales como compuestos piretroides, compuestos organofosforados, compuestos de carbamato, compuestos de N-arildiazol, compuestos de hidrazona, compuestos de sulfonamida o ingredientes insecticidas naturales. Adicionalmente, como ingredientes activos pueden usarse reguladores del crecimiento de insectos, tales como inhibidores sintéticos de quitina, compuestos activos similares a la hormona juvenil y compuestos activos similares a la hormona de la muda. Esto, por no decir que el ingrediente activo que puede usarse en la presente invención no se limita a los compuestos anteriores.

En los huevos miméticos de la presente invención, es preferible que el ingrediente activo sea de acción lenta. Tal como se ha descrito anteriormente, las termitas reconocen los huevos miméticos que tienen un tamaño y una forma similar a la de los huevos naturales y que comprenden la feromona de reconocimiento del huevo en la superficie de los mismos y transferir los huevos miméticos a su masa de huevos en el termitero. Las termitas ingieren el ingrediente activo a través de las conductas de cuidado tales como lamer la superficie del huevo mimético. Cuando algunos individuos de la colonia ingieren el ingrediente activo, el ingrediente activo impregna a la colonia completa a través de la alta frecuencia de trofalaxis mediante alimentación estomodeal y alimentación proctodeal. Por consiguiente, el ingrediente activo preferente usado en la presente invención no ejerce el efecto en el momento de la transferencia de los huevos miméticos o inmediatamente después de la ingestión por las termitas. O el ingrediente activo preferente ejerce el efecto a un grado de no afectar a la conducta tal como la transferencia del huevo mimético o la trofalaxis, y ejerce el efecto después de que los huevos miméticos se transfieran al termitero y se realice la trofalaxis entre muchos individuos. Usando dicho ingrediente activo de acción lenta, pueden exterminarse eficazmente muchos individuos de la colonia diana, y la cantidad de uso del ingrediente activo es pequeña. Por consiguiente, la influencia sobre otros sistemas ecológicos es pequeña. El ingrediente activo de acción lenta que puede usarse para los huevos miméticos de la presente invención no solo incluye un ingrediente insecticida de acción lenta tal como hidrametilnon sino que también un ingrediente inhibidor de la eclosión de acción lenta, un ingrediente inhibidor de la reproducción de acción lenta y un ingrediente inhibidor del crecimiento de acción lenta, pero no se limita a los mismos.

En los huevos miméticos de la presente invención, también es preferible que el material base se fabrique con un material de liberación sostenida. Son preferibles los huevos miméticos en los que la se ha fabricado el material base de un material de liberación sostenida, y de este modo, el huevo mimético se transfiere al termitero y después se libera gradualmente la sustancia activa y las termitas la toman. Dichos huevos miméticos incluyen huevos fabricados con un material que puede degradarse por la saliva de las termitas. Preferentemente, el ingrediente activo está comprendido dentro del material base (por interfusión, mezcla, relleno). Los huevos miméticos se transfieren al termitero y después el material base se degrada por la saliva de las termitas. Así, se libera el ingrediente activo del interior. En particular, en el modo de adición del material base o el modo de disolución de la cápsula anterior o similar, es preferible usar el material base que pueda degradarse por la saliva de las termitas. El material del material base que puede degradarse por la saliva de las termitas puede seleccionarse dependiendo del tipo de enzima digestiva de la saliva de las termitas. Por ejemplo, cuando la celulasa está comprendida en la saliva de las termitas, puede usarse el material base fabricado de material celulósico.

El tipo particularmente preferente de huevo mimético de la presente invención es el tipo de cápsula de disolución anteriormente mencionado. Específicamente, se forma un material base con forma de película que comprende lisozima aislada o una sal de la misma en una forma similar a la de un huevo real (es decir, para que sea una cápsula), y el ingrediente activo está comprendido dentro de la cápsula. Por lo tanto, puede producirse el huevo mimético de la presente invención. El método de formación de dicha cápsula es conocido para los expertos en la materia. Los ejemplos del material de la película incluyen una película de óxido y una película de celulosa. Es preferible que el material base con forma de película tenga unas propiedades de liberación sostenida, y es preferible usar, por ejemplo, una película de celulosa que pueda degradarse por la saliva de las termitas. Los huevos miméticos producidos por dicho modo de sellado de una cápsula también son adecuados para la exterminación de colonias grandes en un campo.

Los huevos miméticos que comprenden el material base fabricado de dicho material de liberación sostenida también son eficaces en el caso en el que la sustancia activa sea de acción lenta, y son particularmente eficaces en el caso en el que la sustancia activa no sea de acción lenta.

También es preferible que el glicerol y/o la celulasa esté comprendida en el material base con el fin de mantener la actividad de la lisozima aislada o una sal de la misma así como la feromona de reconocimiento del huevo en los huevos miméticos de la presente invención, y de que se mantenga sobre la superficie del material base. No se usa necesariamente un glicerol o celulasa con una pureza alta. El contenido del glicerol o la celulasa en el material base pueden determinarse dependiendo de diversos factores tales como el tipo, las características, la cantidad, etc de la lisozima a usar, el tipo de la termita, el tipo o la cantidad de la sustancia activa y el tipo o el grado del efecto deseado.

Además, también es preferible que el material base del huevo mimético de la presente invención comprenda un componente extraído a partir de los huevos de las termitas diana. De este modo, puede obtenerse un efecto de transferencia del huevo más alto. El extracto sin procesar de los huevos puede estar comprendido en el material base, o el extracto purificado puede estar comprendido en el material base. El contenido del extracto sin procesar o el producto purificado del mismo en el material base puede determinarse dependiendo de diversos factores tales como el tipo, las características, la cantidad de lisozima a usar, el tipo de las termitas y el tipo o el grado del efecto deseado. Son conocidos en la técnica y pueden usarse métodos de extracción y purificación de un ingrediente eficaz a partir de los huevos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para exterminar termitas, que comprende proporcionar el huevo mimético de la presente invención a la termita y hacer que la termita transfiera al huevo

mimético a su termitero usando la conducta de transferencia del huevo. Las termitas que se exterminan o se previenen por el método de la presente invención tienen un instinto de transferencia del huevo y reconocen la lisozima como la feromona de reconocimiento del huevo. Por ejemplo, los huevos miméticos de la presente invención pueden colocarse sobre una parte de un camino de hormigas o un material del termitero. Es posible que se abran agujeros en un camino de hormigas por medio de una perforación y se inyecten los huevos miméticos de la invención en los mismos. Es posible que los huevos miméticos de la presente invención se envuelvan en una película protectora tal como el celofán y de este modo se mantenga la duración en el campo. En este caso, puede añadirse una sustancia promotora de la ingestión tal como una solución de extracto de madera o una solución de extracto de madera podrida a la película protectora. También es eficaz el uso de una estación de control para la el método de exterminación de termitas de la presente invención.

La presente invención se describirá además especialmente y en detalle por medio de los siguiente Ejemplos, pero los Ejemplos son únicamente para la ejemplificación y no pretenden limitar la presente invención.

15 Ejemplo 1

Ejemplo 1: Preparación de huevos miméticos y confirmación de la actividad de reconocimiento del huevo de la lisozima

20 Las actividades de reconocimiento del huevo de la lisozima purificada de extracto de huevo de termita (LHT), la lisozima de clara de huevo, (LCH) y una mezcla de lisozima de clara de huevo y celulasa (LCH+CEL) (las tres de acuerdo con la invención) en comparación con un extracto de huevo de termita (EHT), un extracto de huevo de termita degradado por proteinasa (pK) y celulasa (CEL) sola, (ninguno de los tres de acuerdo con la invención) y una solución de glicerina acuosa al 30 % como un control se investigaron usando obreras de *Reticulitermes speratus* (termitas obreras).

Cada una de las muestras de ensayo se preparó del siguiente modo.

30 Se añadieron 800 μ l de agua ultrapura a 400 mg de huevos de *Reticulitermes speratus* en un tubo Eppendorf, y se homogenizaron y se sometieron a tratamiento ultrasónico durante 5 minutos, y se realizó la centrifugación a 15.000 rpm durante 30 minutos. Se liofilizó el sobrenadante, y se disolvieron 5,0 mg del polvo liofilizado en 100 μ l de una solución acuosa de glicerina al 30 % (extracto de huevo de termita). El extracto de huevo de termita preparado del mismo modo como se describe anteriormente se purificó mediante una resina de intercambio catiónico BioRex 70 (BioRad Laboratories, CA, EE.UU.), y además, las fracciones de lisozima se aislaron mediante una columna de cromatografía Q-1 (BioRad Laboratories, CA, EE.UU.) y una columna de cromatografía Metil HIC (BioRad Laboratories, CA, EE.UU.), y se disolvieron 1,0 mg del polvo liofilizado del mismo en 20 μ l de una solución acuosa de glicerina al 30 % (lisozima aislada de extracto de huevo de termita). Se añadió proteinasa (Proteinasa K, Nacalai Tesque, Inc., Kioto) al extracto de huevo de termita preparado del mismo modo que se ha descrito anteriormente, y se trató a 37 °C durante 24 horas (extracto de huevo de termita degradado mediante proteinasa). Se disolvieron 2,0 mg de lisozima de clara de huevo (SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU.) en 10 μ l de una solución acuosa de glicerina al 30 % (lisozima de clara de huevo). Se disolvieron 2,0 mg de celulasa (SIGMA, St. Louis, MO, EE.UU.) en 10 μ l de una solución acuosa de glicerina al 30 % (celulasa). Se disolvieron 10 mg de lisozima de clara de huevo y 10 mg de celulasa en 50 μ l de una solución acuosa de glicerina al 30 % (solución mixta de lisozima de yema de huevo y celulasa).

45 Se añadieron 2,0 μ l de cada una de las muestras de ensayo a cantidades iguales de 100 esferas de vidrio cada una de ellas con un diámetro de 0,5 mm y se mezclaron bien y de este modo la esfera de vidrio se recubrió con la muestra de ensayo. Las esferas de vidrio recubiertas solamente con la solución acuosa de glicerina al 30 % se usaron como un control.

50 Se colocaron 10 huevos de termitas y 20 huevos miméticos, obtenidos por el procedimiento anterior, aleatoriamente en una placa de Petri con un diámetro de 30 mm, y 10 termitas obreras de *Reticulitermes speratus* se colocaron en las mismas, y se permitió que la placa de Petri estuviera en reposo durante 24 horas en una sala a temperatura constante de 25 °C, y después, se investigó la tasa de transferencia de huevos miméticos a la masa de huevos (el experimento se realizó por el mismo procedimiento para cada una de las muestras de ensayo). Se repitieron nueve experimentos para cada ensayo. La tasa de transferencia se convirtió en una raíz del arcoseno y se realizó una comparación estadística con respecto al control mediante un ensayo T bilateral. Exceptuando en el caso del extracto de huevo de termita degradado por proteinasa y el control, las termitas obreras reunieron los huevos dispersos en la placa de Petri para formar una masa de huevos y mostraron una conducta de conservación. La tasa de transferencia de los huevos miméticos recubiertos con cada una de las muestras control en la masa de huevos se muestra en la Fig.1. La fotografía que muestra las situaciones de transferencia de los huevos miméticos a la masa de huevos en un caso de que se proporcionaron los huevos miméticos recubiertos con el extracto de huevo de termita se muestra como Fig. 2.

65 Ejemplo Comparativo 2

Ejemplo 2: Introducción de huevos miméticos en colonias en el estudio de campo

Se añadieron 630 µl de solución acuosa de glicerina al 30 % a 63 mg de un extracto de huevo de termitas liofilizado obtenido en el Ejemplo 1, y se añadió la solución a cantidades iguales de 31.500 esferas de vidrio cada una de ellas con un diámetro de 0,5 mm y se realizó el recubrimiento. En madera de pino rojo, con un taladro se perforó un material del árbol de pino rojo destrozado y con termitero, que tenía colonias maduras de *Reticulitermes speratus*. Todos los huevos miméticos se dividieron en cinco partes y se inyectaron en cinco orificios. Después de 48 horas, el material con termitero se dismanteló completamente, y se sacaron todas las masas de huevos y se investigó la relación de huevos miméticos transferidos a las masas de huevos.

De los 31.500 huevos miméticos inyectados en el material con termitero, se encontraron 6.098 huevos miméticos en las masas de huevos. La relación de introducción de los huevos miméticos después de 48 horas en el campo fue del 19,35 %. Los huevos miméticos se transfirieron en las 60 masas de huevos encontradas en esta colonia y la tasa de transferencia de los huevos miméticos fue del 100 %, lo que es extremadamente alto.

Ejemplo Comparativo 3

Ejemplo 3: Introducción de huevos miméticos que portan un agente de exterminación en una colonia criada en una placa de Petri

Se mezclaron cantidades iguales de 200 esferas de vidrio cada una de ellas con un diámetro de 0.5 mm en 40 µl de una solución acuosa de glicerina al 30 % que contenía 10 µg/ml de la sustancia insecticida de acción lenta hidrametilnon y 50 µg/µl del extracto de huevo de termita, y se realizó el recubrimiento (recubrimiento de 2 µg de hidrametilnon y 10 µg de extracto de huevo de termita por esfera). Los huevos miméticos obtenidos de este modo se usaron como un agente de exterminación. Se proporcionaron 200 huevos miméticos descritos anteriormente a 100 obreras de *Reticulitermes speratus* (termitas obreras) criadas en una placa de Petri de 90 mm, y se permitió que las obreras realizaran la transferencia del huevo y la protección del huevo, y se investigaron la tasa de supervivencia y la tasa de transferencia cada 12 horas.

La cantidad anterior de hidrametilnon no afecta a la actividad de transferencia y se mostró una actividad de transferencia alta igual a la del caso del extracto de huevo de termita solo (la tasa de transferencia fue del 80 %). Las termitas obreras aseaban a los huevos miméticos transportando el agente de exterminación del mismo modo que sus huevos y los cuerpos de las termitas tomaron el hidrametilnon (el hidrametilnon tenía un color amarillo, y el color amarillo se atenuó debido al aseo de las termitas). La tasa de supervivencia fue del 100 % después de 12 horas, sin embargo después de tres días, la tasa de supervivencia fue del 0 % (es decir, las 100 obreras murieron). A partir de estos resultados, se llegó a la conclusión de que el hidrametilnon se diseminó suficientemente en la colonia y ejerció su eficacia mediante el aseo y la trofalaxis.

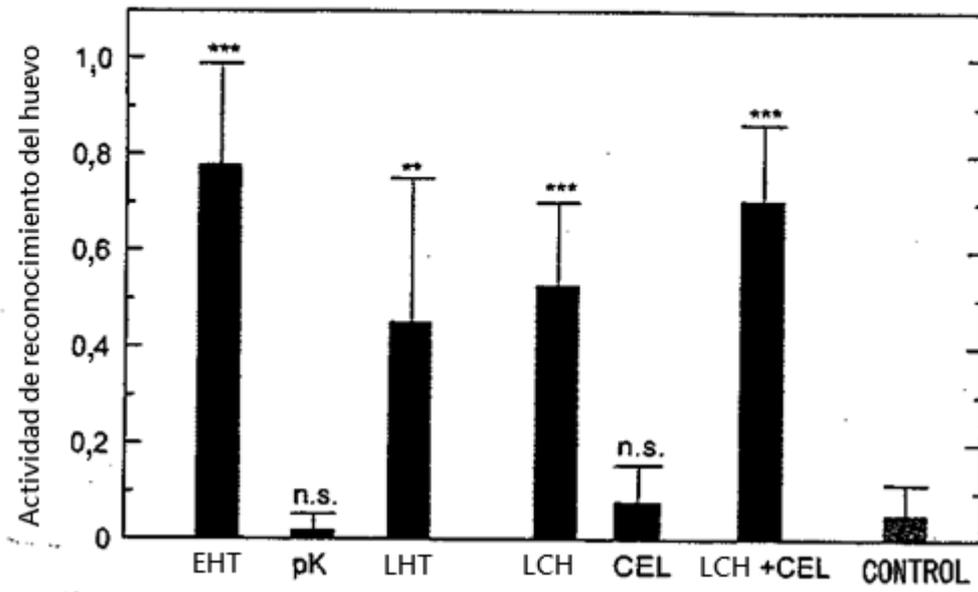
Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona la exterminación eficaz de animales dañinos, particularmente termitas. La presente invención es aprovechable en el campo de la producción de insecticidas, en el campo de la industria de exterminación de animales dañinos, en el campo de la industria de la construcción, en el campo de la industria paisajística.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un huevo mimético que comprende lisozima aislada o una sal de la misma como una feromona de reconocimiento del huevo y una sustancia que lleva cabo la exterminación o la prevención de las termitas en su material base que imita un huevo de una termita.
- 10 2. El huevo mimético de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sustancia que lleva a cabo la exterminación o prevención de las termitas es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un ingrediente insecticida, una sustancia inhibidora de la eclosión, una sustancia inhibidora de la reproducción y un ingrediente inhibidor del crecimiento.
- 15 3. El huevo mimético de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la sustancia que lleva a cabo la exterminación o prevención de las termitas no ejerce su efecto en el momento de la transferencia de los huevos miméticos o inmediatamente después de la ingestión.
- 20 4. Un método para exterminar termitas, que comprende proporcionar a la termita el huevo mimético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y hacer que la termita transfiera el huevo mimético a su termitero usando la conducta de transferencia del huevo.
5. Uso de lisozima o una sal de la misma como una feromona de reconocimiento del huevo de las termitas.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

