

Rosario, 15 de junio de 2016

Comité Evaluador
Subsecretaría de Mercados Agropecuarios
Secretaría de Mercados Agroindustriales
MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA
S _____ / _____ D

Ref.: Exp. S05: 0018383/2016 - Resolución MINAGRO N° 147/2016

Celina Trucco, apoderada de **Bioceres Semillas S.A.**, conforme copia certificada y legalizada del poder acompañada en el expediente de la referencia, y que declaro que se encuentra vigente, con domicilio real en Ocampo 210 bis, Predio CCT, Edificio Indear, Rosario, Provincia de Santa Fe, y domicilio especial constituido en Reconquista 661, Piso 1 Dpto B, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CP 1003), me presento y respetuosamente digo:

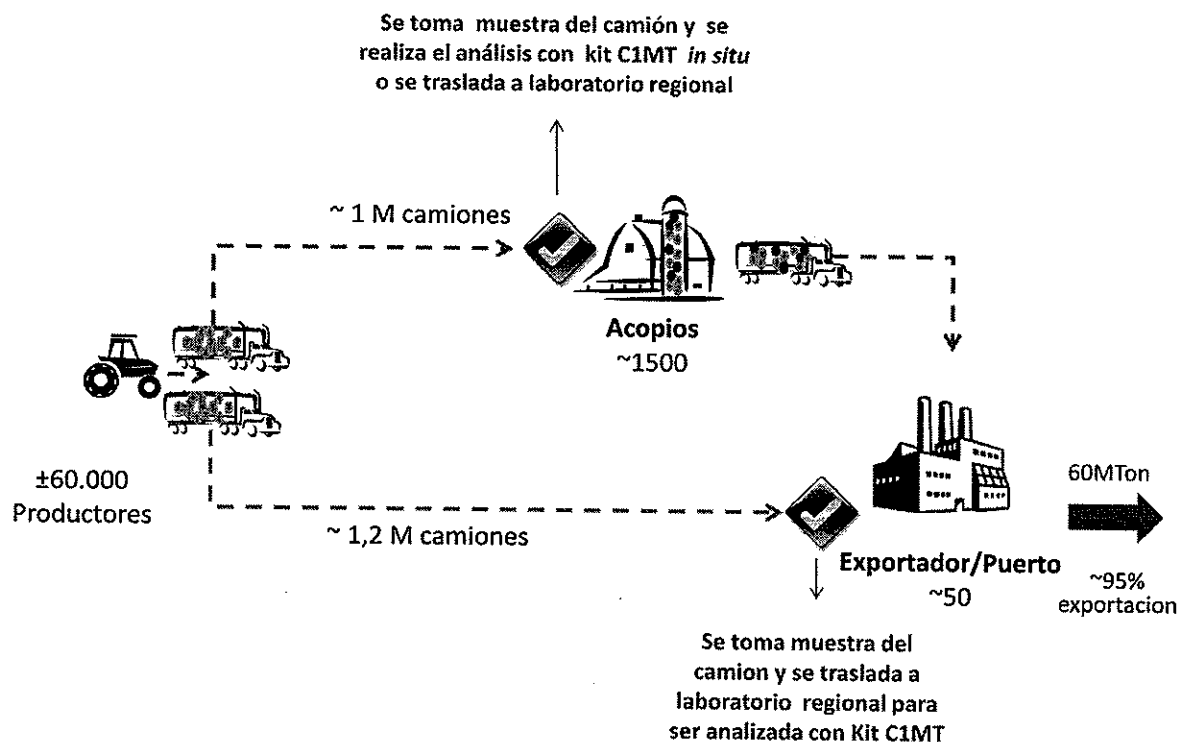
Que en referencia a las inquietudes recogidas luego de la Tercera Reunión del Año 2016 del Comité Evaluador de Sistema de Muestreo, Testeo y Análisis de Detección en Grano de Secuencias de ADN o Proteínas Específicas, celebrada el 8 de Junio de 2016, en relación al tratamiento del expediente N° S05:0018383/2016; se desea ampliar la información remitida anteriormente bajo dicho expediente a los fines de completar y facilitar la evaluación del método presentado.

En las siguientes páginas se provee la siguiente información:

- a) Ampliación con respecto a los fines que se pretende dar al kit C1MT en el comercio de granos.
- b) Ampliación con respecto a la selección del 5% como umbral de detección del kit C1MT.
- c) Ampliación con respecto a modelos matemáticos solicitados para la inter-conversión entre unidades de porcentaje y contenido de la proteína Cry1Ac.
- d) Reformulación de la respuesta al punto 8.2: 'Interpretación práctica de los posibles resultados en el comercio de granos'.
- e) Modelo de la trituradora utilizada con el kit C1MT

a) **Ampliación con respecto a los fines que se pretende dar al Kit C1MT en el comercio de granos:**

El siguiente gráfico ilustra de manera simplificada el flujo de granos de soja en Argentina:



Como se puede ver en el gráfico superior, el productor tiene la posibilidad de entregar su cosecha tanto en un acopio como en un exportador/puerto. En el punto de entrega que elija, el camión será muestreado siguiendo los lineamientos que rigen el Comercio de Granos para la obtención de muestras representativas para análisis comerciales. Las muestras a analizar con el Kit C1MT son sub-muestras obtenidas a partir de estas muestras.

Las muestras de los camiones que entregan su cosecha en un exportador ubicado en zonas cercanas a Rosario, son enviadas a analizar a un laboratorio operado por la Bolsa de Comercio de Rosario. Las muestras tomadas en el resto de los puntos de entrega son analizadas *in situ* o dependiendo de la ubicación y preferencia del punto de entrega en particular, se traslada la muestra a un laboratorio cercano. En la actualidad, varios de los ensayos con el Kit C1MT son realizados por laboratorios regionales operados por las Bolsas de Cereales o Cámaras Arbitrales del país: Bolsa de Comercio de Rosario, Cámara Arbitral de la Bolsa de Cereales de Buenos Aires, Bolsa de Cereales de Córdoba, Bolsa de Comercio de Chaco, Cámara Arbitral de Cereales de Entre Ríos, Bolsa de Comercio de Santa Fe y Cámara Arbitral de Cereales, Oleaginosas, Frutos y Productos de Bahía Blanca.

Estas instituciones siguen estrictas normas para verificar el control de calidad de los insumos que reciben previo a su uso. Como parte de estos procedimientos, también verifican la funcionalidad de cada lote de kits C1MT que reciben, previo a ser utilizado. Brevemente, citando como ejemplo a la Bolsa de Rosario, se realiza un muestreo al azar del 1% de los kits que componen cada lote. De cada kit seleccionado se toman 3 tiras y se ensayan con una muestra negativa (0% de grano INTACTA RR2PRO®), una muestra

con 100% de grano conteniendo Cry1Ac, y una muestra con una proporción intermedia de este grano (20%), siguiendo el procedimiento indicado en el kit C1MT. Se evalúan luego los resultados, y si alcanzan el criterio de aceptación definido por el kit se califica al lote como apto para uso.

b) Ampliación con respecto a la selección del 5% como umbral de detección del kit C1MT:

- 5% como valor de corte para la no detección de presencia adventicia:

El umbral de detección para el kit C1MT ha sido intencionalmente establecido en 5% con el objetivo de proteger al agricultor de un pago improcedente, por la eventual detección de la proteína Cry1Ac producto de una contaminación no intencional.

El umbral de detección de 5% se estableció tomando en consideración las posibles fuentes de contaminación y sus valores habituales para el cultivo de soja bajo los procesos normales de producción, cosecha y transporte.

Las potenciales fuentes de contaminación o presencia adventicia son:

- Polinización cruzada de un lote vecino de soja conteniendo la proteína Cry1Ac.
- Contaminación procedente de la sembradora con restos de grano/semilla de un lote sembrado previamente con soja conteniendo la proteína Cry1Ac.
- Contaminación procedente de una cosechadora con restos de grano/semilla de un lote sembrado con soja conteniendo la proteína Cry1Ac.
- Contaminación procedente de un camión que previamente transportó soja conteniendo la proteína Cry1Ac.

Con relación al primer punto, la contaminación por polen en el cultivo de soja se considera despreciable por tratarse de una especie autógama. En estudios con soja cultivada, en los cuales se han optimizado las condiciones con el fin de asegurar la proximidad entre plantas y la sincronización en la floración, se ha encontrado que el grado de polinización cruzada natural es muy bajo, aún cuando las plantas crezcan muy cercanas unas de otras (Caviness, 1966; Ray *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 2006). Las tasas de polinización cruzada reportada en estos estudios son inferiores al 0,5% en surcos adyacentes (0,9 m), siendo menor a 0,05% a los 5 m, y nula a los 10 m. La distancia habitual entre lotes resulta suficiente para asumir que la contaminación por polen de un cultivo adyacente es despreciable.

Con relación al segundo ítem, la contaminación proveniente de la sembradora, una vez puesta a punto la máquina para la tarea de siembra, se estima que podrían quedar atrapados en lugares de difícil acceso unos pocos granos por tubo de descarga. Asumiendo 20 granos por tubo y 20 surcos por máquina, se llega a unos 400 granos que, considerando un 100% de poder germinativo, en el mejor de los casos, resultaría en 400 plantas. Tomando un promedio de 30 vainas por planta y de 3,3 granos por vaina, se obtendría un total de aproximadamente 100 granos por planta, totalizando 40.000 granos. Teniendo en cuenta un peso promedio de 0,15 g por grano (150g/1000 semilla o grano), esto se traduciría en aproximadamente unos 6 kg a cosecha.

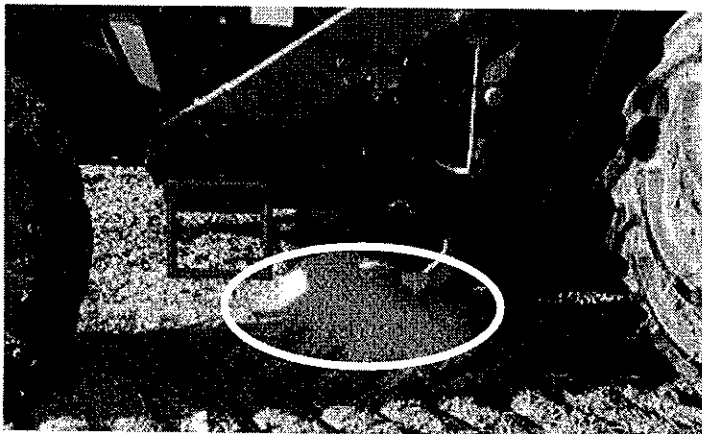
Las otras potenciales fuentes de contaminación en soja son entonces la cosecha y el transporte. En un proceso normal de cosecha en la República Argentina, se parte de un lote de campo que es cosechado por una cosechadora autopropulsada. Esta puede descargar la cosecha directamente en el camión o en un paso

intermedio utilizando una monotolva o carro auto-descargable movido por un tractor que transporta los granos desde la cosechadora al camión, haciendo así más eficiente la labor de la cosechadora. Finalmente el camión llega al acopio y es muestreado para la realización de diferentes análisis entre los cuales se encontraría la presencia de la proteína Cry1Ac.

Teniendo en cuenta el proceso descrito anteriormente, y la consulta con expertos que trabajan no sólo en la producción de soja para consumo sino también en las producciones de soja regulada bajo permiso de la normativa vigente, en la cual se tiene especial cuidado en la limpieza y posible contaminación de las máquinas, se identificaron los puntos críticos donde podría llegar a quedar material que resultara fuente de contaminación. Estos son:

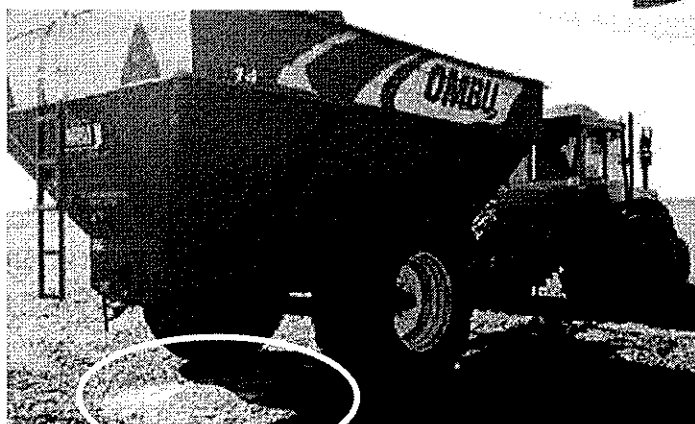
1- En la cosechadora:

Dependiendo del modelo de cosechadora utilizada pueden quedar en la máquina entre 50 y 100 kg de grano como máximo. Estos granos se distribuyen entre el sistema de trilla y la tolva de la cosechadora. A continuación se muestra como ejemplo una foto de una cosechadora modificada para dar una dimensión de la cantidad de soja que puede quedar como posible contaminación.



2- En la monotolva o carro autodescargable:

Este tipo de maquinaria, dependiendo del tipo y modelo, puede llegar a cargar entre 14 y 20 tn. Se calcula que pueden quedar de contaminante unos 30 a 70 kg como máximo. A continuación se muestra como ejemplo una foto de una monotolva y tractor luego de su limpieza para dimensionar la cantidad de soja que se puede obtener como producto de la limpieza. En la foto se ve que la tapa del sinfín ha sido abierta para la limpieza.



3- En los camiones:

En general los camiones de carga están diseñados para que quede la menor cantidad de grano posible luego de su descarga. Asimismo la correcta limpieza, previa a la carga, permite efficientizar los viajes y asegurar la trazabilidad de lo que el productor cosechó en su lote evitando así cualquier tipo de penalización a la hora del muestreo y descarga en atributos de calidad de grano como por ejemplo % de cuerpos extraños.

El lugar donde puede llegar a quedar grano es en las boquillas. Por lo general un camión o chasis tiene 4 boquillas y el acoplado tiene 6 boquillas. En ellas entran entre 1 y 1,5 kg como máximo de material por cada una. Esto daría una posibilidad de contaminación de unos 15 kg como máximo. Si bien durante el calado de los camiones, al momento de la entrega del grano, las boquillas no aportan material para el muestreo, han sido incluidas en el análisis para contemplar la situación más desfavorable y tener el panorama de mayor margen de seguridad.

Si se suman los valores máximos de contaminación proveniente de los procesos anteriormente descriptos, se llega a un valor total de 191 kg (6 kg de la sembradora, 100 kg de la cosechadora, 70 kg por la monotolva y 15 kg por camión). El promedio de carga de los camiones de transporte de grano en Argentina es de aproximadamente 30.000 kg. Teniendo esto en consideración, el valor estimado de 188 kg representaría el 0,63% de la carga de un camión, valor que se encuentra un orden por debajo del umbral de detección del método.

Transformando este umbral en la masa a detectar en un camión, el 5% representa 1.500 kg del total de carga. Esto significa que la suma de las diferentes fuentes probables de contaminación debería resultar inferior a este valor para confirmar el objetivo de proteger al agricultor de una detección incorrecta.

En conclusión, el razonamiento descripto anteriormente demuestra que un nivel de corte del 5% supera ampliamente cualquier tipo de contaminación que podría resultar de la transición de una producción de soja conteniendo la proteína Cry1Ac a otro que no la contiene.

- Conversión del umbral 5% en muestra al umbral estimado en lote:

El muestreo de las diferentes cargas para los análisis a realizar con el Kit C1MT se realizan en destino, siguiendo los lineamientos propuestos por la Resolución SAGyP N°1075/94 – Anexo XXII- Norma XXII y Anexo XXIIb – Anexo B. Esta resolución rige el Comercio de Granos para la obtención de los análisis

comerciales correspondientes. Dichos lineamientos han sido establecidos con la finalidad de que las muestras analizadas sean representativas de la carga. Este mismo protocolo se realiza también para la toma de muestras comerciales habituales para el comercio granario y para evaluar la calidad de los granos durante la comercialización de la soja. Las operaciones de compra-venta y entrega se rigen de acuerdo a la Resolución SAGyP N° 151/2008, la cual también establece las normas de calidad para la comercialización de granos de soja (Norma XVII). Como se comentó previamente, a fin de evaluar la calidad de la mercadería de cada entrega se extrae UNA (1) muestra representativa de acuerdo a lo establecido en la Norma XXII (Muestreo en granos) que refleja la calidad del lote entregado. Los diferentes análisis que determinaran la calidad de la misma incluyen, entre otros, los siguientes:

1. Materias extrañas (para recibo y/o comercialización)
2. Granos quebrados y/o partidos (para recibo y/o comercialización)
3. Granos dañados (para recibo y/o comercialización)
4. Granos verdes (para recibo y/o comercialización)
5. Granos negros (solo para recibo)
6. Humedad (solo para recibo)
7. Chamico (*Datura ferox*) (solo para recibo)
8. Insectos y/o arácnidos vivos (solo para recibo)

En la Tabla 1 se muestran los valores umbrales de cada determinación a cuales se encuentran sujetas las entregas de soja de acuerdo a la base de comercialización y a las tolerancias de recibo.

En todos los casos los resultados obtenidos sobre las muestras analizadas son directamente extrapolados a la carga o al lote entregado sin mediar transformación alguna. Se asume que el error de muestreo es despreciable en relación al error de cada método analítico utilizado. Para la mercadería que exceda alguno de los umbrales aceptables de dichas determinaciones se aplican rebajas o mermas de acuerdo a las bases de comercialización o a las tolerancias de recibo (Tabla 1).

Para el análisis de presencia de la proteína Cry1Ac en particular, cabe recordar que se trata de un método cualitativo, cuyo resultado será reportado como positivo o negativo, donde el error se expresa como % de falsos positivos aceptados. En tal sentido se utilizan 100 granos para la determinación, lo que garantiza una tasa de falsos positivos menor al 1% con un intervalo de confianza del 95%, lo que se ajusta a los estándares admisibles.

Tabla 1: Norma de calidad para la comercialización de soja – Norma XVII (Resolución SAGyP N° 151/2008).

RUBROS	BASES (%)	TOLERANCIA DE RECIBIDO (%)	REBAJAS	MERMAS
Materias extrañas	1	3,0	Para valores superiores al 1,0% y hasta el 3,0% a razón del 1,0% por cada por ciento o fracción proporcional. Para valores superiores al 3,0% a razón del 1,5% por cada por ciento o fracción proporcional.	
Incluido Tierra	0,5	0,5	Para valores superiores al 0,5% a razón del 1,5% por cada por ciento o fracción proporcional.	
Granos negros	---	1,0	---	

Granos quebrados y/o partidos	20,0	30,0	Para valores superiores al 20,0% y hasta el 25,0% a razón del 0,25% por cada por ciento o fracción proporcional. Para valores superiores al 25,0% y hasta el 30,0% a razón del 0,5% por cada por ciento o fracción proporcional. Para valores superiores al 30,0% a razón del 0,75% por cada por ciento o fracción proporcional.	
Granos dañados (brotados, fermentados, ardlidos, dañados por calor, podridos)	5,0	5,0	Para valores superiores al 5,0% a razón del 1,0% por cada por ciento o fracción proporcional.	
Incluido granos quemados o "arveja"	----	1,0	Para valores superiores al 1,0% a razón del 1,0% por cada por ciento o fracción proporcional.	
Granos verdes	5,0	10,0	Para valores superiores al 5,0% se rebajará a razón del 0,2% por cada por ciento o fracción proporcional.	
Humedad	----	13,5	----	Para mercadería recibida que exceda la tolerancia de recibo, se descontarán las mermas correspondientes, de acuerdo a las tablas establecidas.
Chamico	----	5 sem. c/kg	----	Para mercadería recibida que exceda la tolerancia de recibo, se practicarán las mermas correspondientes.
Insectos y arácnidos vivos	----	Libre		

- Estudios para evidenciar el umbral del 5% del kit C1MT en el comercio de granos local:

Con el objetivo de verificar el umbral de detección del 5% de la tira C1MT sobre muestras locales en un mayor número y variabilidad de muestras, se encargó la realización del ensayo que se describe a continuación al laboratorio Rayen, sito en la localidad de Pergamino.

Se ensayaron un total de 100 muestras de grano/semilla comerciales y pre-comerciales de soja INTACTA RR2 PRO ® cosechados durante 2014 y provenientes de distintas localidades representativas de la zona núcleo sojera Argentina (Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe) así como del norte argentino y Paraguay. Dichas muestras, además, correspondían a distintas variedades con diferentes grupos de madurez y pertenecientes a diferentes empresas obtentoras, lo cual agregó variabilidad al set de muestras evaluado.

En primer lugar, las muestras de INTACTA RR2 PRO ® se evaluaron en forma ciega al 100% siguiendo las indicaciones incluidas en el inserto del kit. De la misma manera, se verificó la negatividad al 100% de la muestra RR1 que posteriormente se usó como fondo para preparar las mezclas.

Posteriormente, para cada una de las muestras, se prepararon mezclas al 20% (esto es 20 semillas/granos de la muestra codificada en 80 granos/semillas RR1) que se ensayaron siguiendo las mismas indicaciones incluidas en el inserto del kit.

Finalmente, y de acuerdo al resultado obtenido, se realizaron nuevas mezclas en mayor o menor porcentaje, al menos hasta comprobar el porcentaje de la mezcla a la que cambiaba el resultado obtenido con la tira CIMT (de Positivo a Negativo, o viceversa, según el caso).

En la Tabla 3 se muestran los resultados completos obtenidos con las tiras CIMT para cada una de las mezclas preparadas a partir de las 100 muestras en los porcentajes evaluados. En todos los casos, los porcentajes a los que las mezclas dieron reactividad positiva estuvieron por arriba del 5%.

En la Tabla 2 y el gráfico que la acompaña, se resumen los resultados del ensayo. Los mismos muestran que para ninguna de las mezclas al 5% se observaron resultados positivos, y que la tira comienza a arrojar resultados positivos por arriba de este valor. Por otra parte, para este set de muestras, todas las muestras detectadas como positivas por las tiras CIMT contenían entre el 10% y el 35% de la tecnología INTACTA RR2 PRO®.

En conclusión, los resultados muestran que la tira CIMT cumple con las especificaciones del fabricante, o sea no se detecta la proteína Cry1Ac en muestras con menos de 5 granos o semillas expresando dicha proteína en un total de 100 granos o semillas.

Por otra parte, los resultados del estudio realizado localmente con un mayor número y variabilidad de muestras, coinciden con los resultados obtenidos durante la validación del kit (VAL12-022RR), y con los resultados del ensayo realizado por IRAM. En los tres casos se confirma el valor de corte del 5% declarado por el fabricante, sumando evidencia de que el método resulta confiable y apropiado a los fines que se pretende darle en el comercio de granos.

Tabla 2: Resumen del número de muestras que arrojaron resultados positivos con la tira C1MT para los distintos porcentajes de mezcla INTACTA RR2 PRO ® indicados.

% de INTACTA RR2 PRO®	N° muestras Positivas	N° muestras Positivas (Acumulado)
5%	0	0
10%	6	6
15%	23	29
20%	37	66
25%	18	84
30%	15	99
35%	1	100

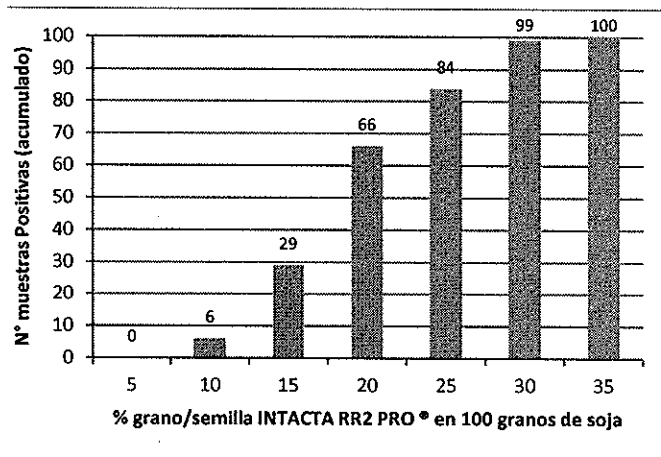


Tabla 3: Resultados de la tira C1MT alrededor de los porcentajes de mezcla en los en que la tira cambia su reactividad.

N = resultado negativo; P = resultado positivo.

Código Muestra	% grano/semilla INTACTA RR2 PRO® en 100 granos soja													% mezcla en que la tira C1MT se vuelve negativa	% mezcla en que la tira C1MT se vuelve positiva	
	100%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%			
B1-1	P			N	P	P									15	20
B2-1	P		N	P	P	P	P	P							10	15
B3-1	P		N	N	P	P	P								15	20
B4-2	P		N	P	P	P	P	P							10	15
B5-1	P	N	P	P	P										5	10
B6-1	P	N	N	P	P	P	P								10	15
B7-1	P	N	N	P	P	P	P	P							10	15
B8-1	P		N	P	P	P	P								10	15
B9-1	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P					10	15
C1-1	P	N	P	P	P	P									5	10
C2-1	P	N	N	P	P	P	P	P							10	15
C3-1	P			N	P	P	P	P							15	20
C5-1	P		N	P	P										10	15
C6-1	P		N	P	P	P	P								10	15
E1-1	P			N	P	P	P	P							15	20
E2-1	P		N	N	N	P	P								20	25
E3-1	P		N	N	P	P									15	20
E4-1	P		N	N	N	P	P	P	P	P	P				20	25
E5-1	P		N	P	P	P	P								10	15
E6-1	P		N	N	N	N	P	P	P						25	30
E7-1	P		N	N	P	P	P	P	P						15	20
E8-1	P		N	N	N	P	P	P	P	P					20	25
E9-1	P				N	N	P	P							25	30

J8-1	P		N	N	P	P										15	20
J9-1	P		N	N	P	P	P	P	P							15	20
J10-1	P		N	N	P	P	P	P								15	20
J11-1	P		N	N	P	P	P	P	P	P	P	P				15	20
J12-1	P	N	N	N	P	P										15	20
J13-1	P				N	N	P	P	P	P						25	30
J14-1	P				N	N	P									25	30
J15-1	P			N	N	P	P	P	P							20	25
J16-1	P				N	N	P	P								25	30
J17-1	P				N	N	P	P								25	30
J18-1	P				N	P	P	P								20	25
K1-1	P		N	N	N	P	P	P	P							20	25
K2-1	P		N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P			25	30
K3-1	P		N	N	N	P	P	P	P							20	25
K4-1	P		N	P	P	P	P									10	15
K5-1	P		N	N	P	P	P	P								15	20
K6-1	P		N	N	N	P	P									20	25
M1-1	P				N	N	P									25	30
M2-1	P		N	N	N	P										20	25
M3-1	P			N	N	P										20	25
M4-1	P	N	N	N	P	P	P	P								15	20
M5-1	P		N	N	N	P	P									20	25

- Uso del kit CIMT en Argentina, Paraguay y Brasil:

Diversos laboratorios regionales operados por Bolsas de Cereales y Cámaras Arbitrales de Argentina realizaron este tipo de análisis sobre la soja cosechada de la campaña 2014/15, y se encuentran realizando este tipo de análisis en la actualidad (cosecha 2015/16). A modo de ejemplo, la Bolsa de Rosario, informó que durante marzo y abril de 2016 ha analizado 118.231 muestras y 10.838 muestras (9,2%) fueron positivas. Por su parte la Cámara Arbitral de la Bolsa de Cereales de Buenos Aires, que cuenta con 8 laboratorios satélites, analizó entre marzo y junio de 2016 un total de 86.691 muestras, de las cuales 9.185 (10,6%) resultaron positivas; la Bolsa de Comercio de Santa Fe analizó en el mismo periodo 20.276 muestras de las cuales 4.954 (24,4%) resultaron positivas; solo por citar algunos casos.

A la vez, el kit CIMT es utilizado actualmente en Brasil y en Paraguay para detectar la proteína Cry1Ac en granos de soja. En Paraguay, en la campaña 2015/16 hubo 200 puntos de entrega y ya se han recibido y testado más de 5.600.000 tn de soja, resultando 1.344.000 tn positivas para la detección de la proteína Cry1Ac. Del mismo modo, en Brasil hay actualmente 3.500 puntos de entrega y en esta campaña ya se han testeado 59.000.000 tn resultando positivas 7.000.000 tn.

Es de interés notar que el Ministerio de Agricultura de Brasil (MAPA) ha publicado un artículo denominado "Métodos para determinación de pureza genética de semillas: Inmunocromatografía para la validación de Presencia Adventicia de OGM en semillas" (Costa Do Valle, 2010 - copia adjunta, Anexo 12) donde hace referencia a otros formatos de test inmunocromatográficos diseñados para determinación de Presencia Adventicia de OGM en semillas, que podrían adaptarse para otros fines. Específicamente describe que al realizar el testeo utilizando únicamente 60 granos, es posible modificar el umbral inferior al 5% con un 95% de confianza con el fin de verificar la necesidad del pago de regalías.

c) **Ampliación con respecto a modelos matemáticos solicitados para la interconversion entre unidades de porcentaje y contenido de la proteína Cry1Ac en grano:**

- **Contenido de la proteína Cry1Ac en grano:**

Con el objetivo de ampliar el punto 1.4 del formulario original, es importante marcar que para el desarrollo del Kit C1MT, se utilizaron 10 variedades de INTACTA RR2 PRO ®, como muestra la Tabla 2 del reporte VAL011-050R, debajo resumida. Como se puede ver, la expresión relativa de la proteína Cry1Ac se encontró entre 0,23 y 0,65 µg/grano:

Tabla 2 del Reporte VAL011-050R:

Código de variedad	Expresión relativa de Cry1Ac (µg Cry1Ac/g de grano)	Peso promedio de 1 grano (g)	Cry1Ac estimada en 1 grano (µg)	Rango de expresión
11275666	3,30	0,1966	0,65	High Expresser
11275667	1,64	0,184	0,30	
11275668	1,87	0,1814	0,34	
11275669	1,97	0,1553	0,31	
11275670	1,65	0,1514	0,25	
11275671	1,66	0,1677	0,28	
11275672	1,69	0,1603	0,27	
11275673	1,20	0,1635	0,20	Low expresser
11275674	1,63	0,1413	0,23	
11275675	1,84	0,1832	0,34	

Para la validación del Kit C1MT, se utilizaron 7 variedades de INTACTA RR2 PRO ®, como muestra la Tabla 2 del reporte VAL12-022R, debajo resumida.

Como se puede ver, la expresión relativa de de la proteína Cry1Ac en estos ensayos se encontró entre 0,08 y 0,2 µg/grano:

Tabla 2 del Reporte VAL12-022R:

Código de variedad	Expresión relativa de Cry1Ac (µg Cry1Ac/g de grano)	Peso promedio de 1 grano (g)	Cry1Ac estimada en 1 grano (µg)	Rango de expresión
11275666	1,04	0,197	0,20	High Expresser (HE#1)
11275673	0,48	0,168	0,08	
11307416	0,25	0,179	0,04	Low Expresser (LE#2)
11307418	0,51	0,151	0,08	
11307419	1,02	0,144	0,15	High Expresser (HE#2)
11307422	0,22	0,168	0,04	Low Expresser (LE#1)
11307434	1,12	0,127	0,14	

Los niveles de expresión de la proteína Cry1Ac nativa fueron estimados en base a ensayos de ELISA y son relativos, calculados en función de la curva estándar que se realizó diluyendo una concentración conocida de proteína Cry1Ac recombinante, cuya concentración se determinó mediante un método de

cuantificación absoluta (análisis de composición aminoacídica). Estos datos de expresión obtenidos mediante ELISA fueron utilizados únicamente para clasificar las variedades utilizadas en los estudios de validación según su rango de expresión.

Los datos de expresión relativa de la proteína Cry1Ac de las variedades analizadas varían entre los estudios realizados durante el desarrollo (VAL011-050R) y durante la validación (VAL12-022R), ya que el protocolo de ELISA utilizado durante cada uno de ellos es diferente, y se utilizaron distintos anticuerpos y distintas condiciones de ensayo. A los inicios, durante los ensayos de desarrollo, se utilizó un determinado ensayo de ELISA, que se fue optimizando a lo largo del tiempo. Para los análisis realizados en los ensayos de validación (VAL12-022R), se ha utilizado el ensayo de ELISA ya optimizado. Por otro lado, es conocido que los resultados que arrojan los ensayos de ELISA realizados por diferentes analistas durante diferentes días poseen una variabilidad del 20-25% (Farid E Ahmed, 2004; Lipton *et al*, 2000), por lo que la variabilidad observada entre los distintos ensayos es esperable.

- Interconversión entre unidades de porcentaje y contenido de la proteína Cry1Ac en grano:

Ensayos de efecto gancho con la proteína Cry1Ac nativa:

Ampliando el **punto 2.6** del formulario original, durante la validación del kit C1MT se realizaron análisis con muestras de soja INTACTA RR2 PRO ® para evaluar el efecto gancho. Para tales ensayos se utilizó la variedad que mostró mayor concentración de Cry1Ac por grano, tomando en cuenta tanto la concentración de proteína por grano como el tamaño del grano. El objetivo fue evaluar el efecto gancho en el caso más extremo, o sea, en presencia de la mayor cantidad de analito (proteína Cry1Ac) posible. Como muestra la Tabla 2 del informe de validación VAL12-022R, la variedad que mostró mayor concentración de proteína por grano en las variedades disponibles utilizadas durante los estudios de validación fue la 11275666, identificada también en la tabla como High Expresser (HE#1).

Para estudiar el efecto gancho se analizaron mediante el kit C1MT diferentes proporciones de este grano en incrementos del 10%, hasta llegar al 100% de grano de la variedad 11275666. A partir del 20% todos los resultados fueron positivos, y no se observó disminución en la intensidad de la señal positiva de la línea de ensayo, lo que indica la ausencia del efecto gancho.

Si se quisiese establecer un modelo matemático que relacione el porcentaje de granos con contenido de Cry1Ac, se podrían hacer los siguientes cálculos:

- Concentración de Cry1Ac en la variedad 11275666= **0,20 µg Cry1Ac/grano.**
- Si la proteína extraída de **un grano** de la variedad 11275666 se diluye en **100 ml** de agua (asumiendo 100% en la eficiencia de extracción), la proteína Cry1Ac se encontrará en una concentración de **0,0020 µg Cry1Ac/ml = 2,0 ng Cry1Ac/ml**

En base a estos datos, es posible armar la siguiente tabla para la variedad 11275666, en la cual se muestra la concentración de Cry1Ac que se encontraría en un volumen final de 100 ml si se procesan las distintas proporciones según el inserto del kit C1MT:

Conversión entre porcentaje de la proporción y contenido de proteína Cry1Ac:

% Proporción (numero de granos 11275666 en 100 granos totales)	ng de Cry1Ac nativa/ml (*)
---	-----------------------------------

1%	2
5%	10
10%	20
20%	40
30%	60
40%	80
50%	100
60%	120
70%	140
80%	160
90%	180
100%	200

* La concentración final de la proteína Cry1Ac nativa en 100 ml de agua se encuentra sobreestimada, ya que para este cálculo se ha considerado una eficiencia de extracción del 100%. La eficiencia de extracción no ha sido determinada durante la elaboración del kit CIMT. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que cualquier variabilidad que pudiese existir en la eficiencia de extracción entre los diferentes análisis fue contemplado durante los ensayos de desarrollo del kit CIMT, y su reproducibilidad queda demostrada por la consistencia de los resultados obtenidos sobre una misma muestra durante los ensayos de validación.

Los resultados de los ensayos del efecto gancho muestran que todas las proporciones preparadas con esta variedad al 20% o superior dan resultados consistentemente positivos al ser procesadas con el Kit CIMT. Si se quisiese intentar convertir este resultado a unidades de proteína diana mediante la tabla de conversión recién mostrada, se podría estimar que valores iguales o mayores a **40 ng de Cry1Ac/ml (20 granos)** serían consistentemente detectados por el kit CIMT.

Efecto gancho con la proteína Cry1Ac recombinante pura:

Según se explicó en el **punto 2.6**, para corroborar la ausencia del efecto gancho observada en las pruebas con la variedad 11275666, se agregó una pequeña dosis de Cry1Ac recombinante pura a una preparación de semilla convencional, procesada según el procedimiento indicado en el kit CIMT, y se fue aumentando la dosis en pequeños incrementos hasta que se visualizó un resultado positivo consistente en la línea de ensayo, lo cual se logró a una concentración de 50 ng/ml. La concentración siguió aumentándose en incrementos de 50 ng/ml (100, 150, 200...400 ng/ml) hasta llegar a un máximo de 400 ng/ml. No se observó disminución en la intensidad de la señal positiva de la línea de ensayo a medida que se fue incrementando la concentración de proteína recombinante, lo que corrobora la ausencia del efecto gancho.

Si se quisiese intentar convertir este resultado a proporción o número de granos mediante la tabla de conversión recién mostrada, **50 ng/ml de proteína Cry1Ac recombinante pura equivaldrían a 25 granos de la variedad 11275666**. Hay que recordar que este valor no es preciso ya que la eficiencia de extracción no es del 100%. De todas formas, al corroborar el análisis del efecto gancho se ha utilizado hasta 400 ng/ml de proteína recombinante pura, lo que duplica el máximo teórico que se podría extraer de 100 granos de la variedad 11275666 (200 ng/ml), lo que indica que aun a altas eficiencias de extracción, no se observaría efecto gancho.

De todas formas, cabe aclarar que a los usos previstos del método, la presencia o ausencia del efecto gancho no sería relevante, ya que de manifestarse daría un resultado falso negativo que no perjudicaría al productor.

Referencias:

- **Farid E Ahmed (Editor), 2004.** Testing of genetically modified organisms in food, pg 127-8. (ISBN: 1-56022-273-5)
- **Lipton *et al*, 2000.** Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. Food and Agricultural Immunology 12(2):153-164.

d) Reformulación de la respuesta al punto 8.2: 'Interpretación práctica de los posibles resultados en el comercio de granos':

Se solicita reformular la respuesta al **punto 8.2** de la siguiente manera:

RESULTADO POSITIVO: La Tira QuickStix™ C1MT presenta en forma visible ambas líneas (Línea de Ensayo y Línea de Control) a los 5 minutos. Esto indica que la proteína Cry1Ac está presente en cantidad igual o mayor al 5% de granos conteniendo la proteína sobre granos que no la contienen, en el lote muestreado, con una confianza del 95%, siendo la probabilidad de resultado falso positivo menor a 1%.

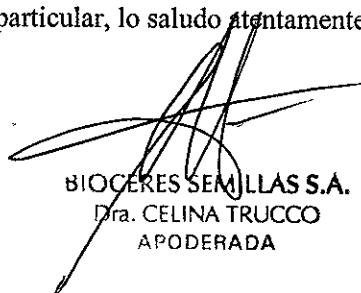
RESULTADO NEGATIVO: La Tira QuickStix™ C1MT presenta la Línea de Control en forma visible y no se observa la Línea de Ensayo a los 5 minutos. Esto indica que la proteína Cry1Ac se considera ausente en el lote ensayado.

RESULTADO INVÁLIDO: La Tira QuickStix™ C1MT no presenta línea de Control a los 5 minutos. Esto es independiente de si se visualiza o no la Línea de Ensayo, y significa que la tira reactiva QuickStix™ C1MT se ha inactivado o el ensayo fue realizado de manera incorrecta.

e) Modelo de la trituradora utilizada con el kit C1MT

La trituradora utilizada en el kit C1MT es marca Oster®, modelo: 6805-354.

Sin otro particular, lo saludo atentamente.



BIOCERES SEMILLAS S.A.
Dra. CELINA TRUCCO
APODERADA

