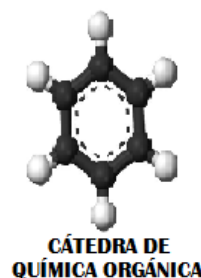




República Bolivariana de Venezuela  
Ministerio del Poder Popular para la Educación  
U.E. Colegio "Santo Tomás de Villanueva"  
Departamento de Ciencias  
Cátedra: Química Orgánica  
Año: 5° A, B y C  
Prof. Luis Aguilar



### TRABAJO PRÁCTICO N° 4

NOMBRE DEL ALUMNO: \_\_\_\_\_ N° DE LISTA: \_\_\_\_\_

AÑO-SECCIÓN: \_\_\_\_\_ EQUIPO: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

1.- **TÍTULO:** Aislamiento e hidrólisis de la caseína de la leche.

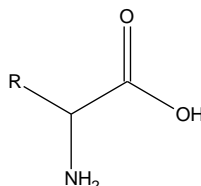
2.- **COMPETENCIAS A ALCANZAR:** Los alumnos deberán:

2.1 -Aislar caseína de la leche a partir de su punto isoelectrico empleando técnicas convencionales de laboratorio para realizar pruebas de reconocimiento de proteínas.

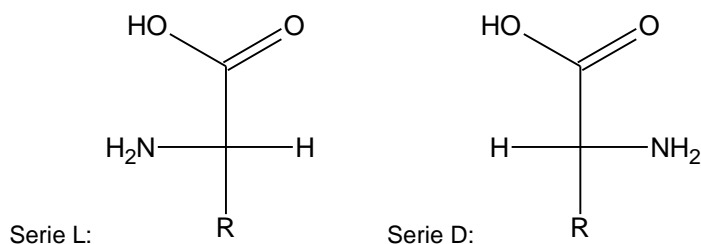
3.- **MARCO TEÓRICO:**

#### PROTEÍNAS:

Las **proteínas** son las biomoléculas más complicadas estructuralmente. Poseen pesos moleculares muy altos y de rango muy amplio. Están formadas por unidades de  **$\alpha$ -aminoácidos**, que presentan la fórmula general:

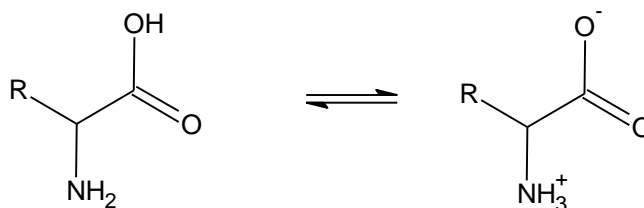


El grupo R puede ser un átomo de hidrógeno o un radical más complicado, en cuyo caso, el carbono  $\alpha$  es un centro quiral. Por ello esta familia, excepto la glicina, donde R = H, presenta actividad óptica. En la naturaleza predomina casi en forma absoluta la serie L.

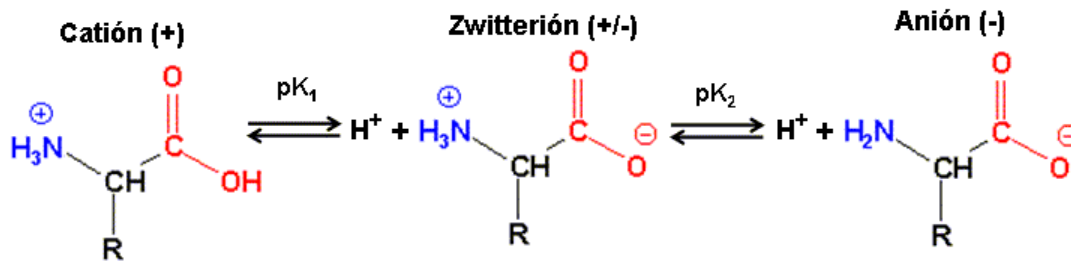


Se supone que la razón de que esto sea así es que cuando los aminoácidos se unen para formar las proteínas, los grupos R, que son los más abultados, tiene menor molestia estérica pues se orientan hacia afuera en el complicado arreglo espacial de estas moléculas.

Debido a que los aminoácidos poseen un grupo carboxílico y uno amínico, en su estado neutro siempre hay un equilibrio con su par iónico interno o "**switterión**":



Dependiendo del pH del medio donde se encuentren, los aminoácidos pueden estar cargados positiva o negativamente y se establece el equilibrio:

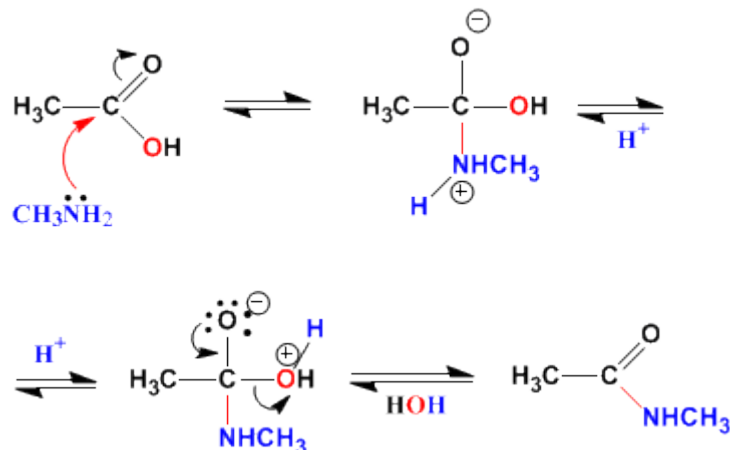


El **punto isoeléctrico** es el pH del medio en el cual la especie está neutralizada por sí misma, o sea, que presenta igual número de cargas positivas y negativas. En este punto, la molécula es menos soluble en medio acuoso, pues en una forma global es menos polar, debido a la compensación interna de cargas.

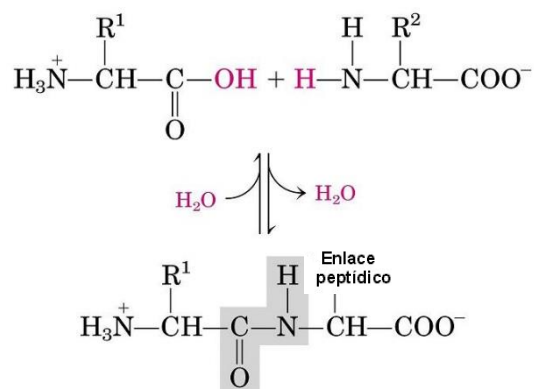
Debido a esta naturaleza dipolar, los aminoácidos presentan características físicas parecidas a los compuestos salinos más que a las de aminas o ácidos carboxílicos:

- Son sólidos cristalinos, no volátiles y de puntos de fusión altos, debido a que son sales internas.
- Son poco solubles en disolventes orgánicos poco polares, pero se disuelven apreciablemente en agua, debido al carácter de par iónico.
- Las constantes de acidez y basicidad son muy bajas ( $10^{-10} - 10^{-12}$ ), comparadas con las de las aminas y ácidos orgánicos ( $10^{-4} - 10^{-5}$ ), esto debido a su neutralización interna.

Una amina y un ácido reaccionan entre sí para producir una amida, según el mecanismo:



En el caso de los aminoácidos, ocurre algo similar para formar los péptidos y la unión del carbono carbonílico con el nitrógeno se conoce con el nombre de **enlace peptídico**. Como siguen existiendo un grupo amínico y uno carboxílico, pueden producirse uniones entre varias unidades para dar como resultado la familia de los polipéptidos. Las proteínas son entonces péptidos de alto peso molecular y se distinguen de los polipéptidos no solo porque son los más grandes, sino porque tienen la propiedad de adoptar una configuración espacial compleja y de variadas características.

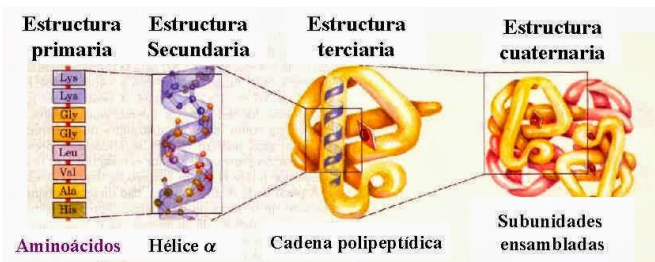


La secuencia de aminoácidos en una proteína es lo que se conoce como su **estructura primaria**. Siempre en un extremo hay un grupo amino terminal y en el otro uno carboxílico terminal, presentando en el medio unidades ligadas por enlaces peptídicos.

La cadena de aminoácidos no es lineal, sino que los diferentes grupos amino y carboxilo interactúan mediante la formación de puentes de hidrógeno, lo que hace que adopte cierta forma en el

espacio, que conforma la **estructura secundaria**. Predominan dos tipos, postuladas por Pauling y Corey en los años 50:

- ✓ **A-Hélice**, para un tipo de proteínas llamado **globular**, por ser en cierta forma esféricas y compactas y por lo tanto solubles en agua.
- ✓ **Estructura  $\beta$** , para las proteínas **fibrosas**, más bien alargadas y planas e insolubles en agua.



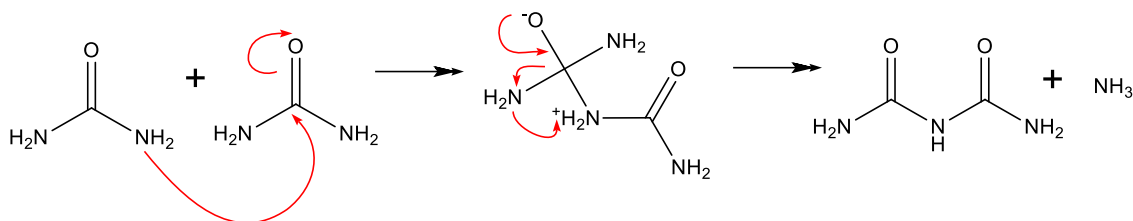
Estas cadenas, una vez tomada su forma, sufren asociaciones adicionales, ya sea por enlaces covalentes tipo disulfuro, por enlaces iónicos entre grupos polares, por interacciones electrostáticas o por atracciones no polares tipo Van Der Waals, lo que reafirma una forma tridimensional más definida, que es la **estructura terciaria**, sobre la cual recae la mayor

responsabilidad acerca de la actividad fisiológica de la proteína. Cuando estas interacciones se rompen por mucho calentamiento, cambios bruscos en el pH del medio, cambio fuerte del medio solvatante, etc, se dice que la proteína sufre **desnaturalización**, lo que no es más que un proceso reversible que implica pérdida de su actividad como ente bioquímico, por destrucción de la estructura terciaria. En algunos casos va acompañada de **coagulación**, que ocurre más bien cuando se altera la estructura secundaria. Una destrucción de la estructura primaria, con ruptura en los enlaces peptídicos, para dar la mezcla de los aminoácidos constituyentes de la proteína original, se logra mediante la **hidrólisis** en medio ácido o básico, o también por la acción de enzimas. El producto de la hidrólisis puede ser convenientemente analizado por cromatografía de papel, para determinar los aminoácidos presentes en cantidades mayoritarias.

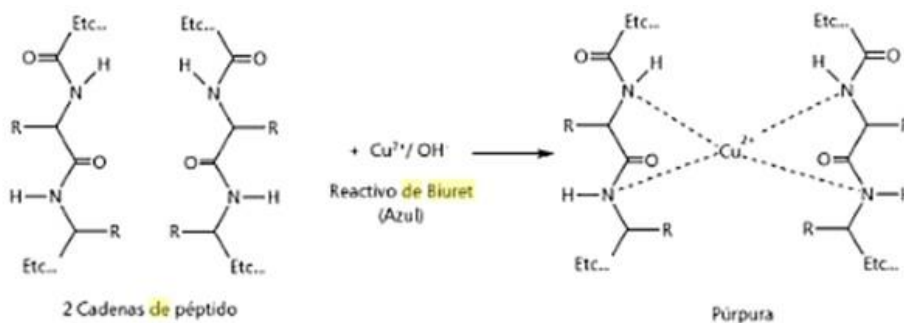
En cuanto a la forma de las proteínas, actualmente se habla además de una **estructura cuaternaria**, pues hay evidencia de cierta tendencia de algunas proteínas a agruparse en unidades activas constituidas por varias subunidades, cada una con tres estructuras definidas.

Las características químicas de las proteínas tienen relación directa con sus aminoácidos estructurales y, como ellos, presentan el equilibrio ácido-base típico de los compuestos anfotéricos, con su correspondiente punto isoeléctrico. Siendo estructuras muy complicadas, pueden actuar como ligandos frente a iones de átomos pesados, si tienen en ese momento la carga apropiada. Estos complejos son en general muy voluminosos e insolubles en medio acuoso, por lo que precipitan. Es muy conocido el uso de la clara de huevo en caso de envenenamiento con agentes de este tipo.

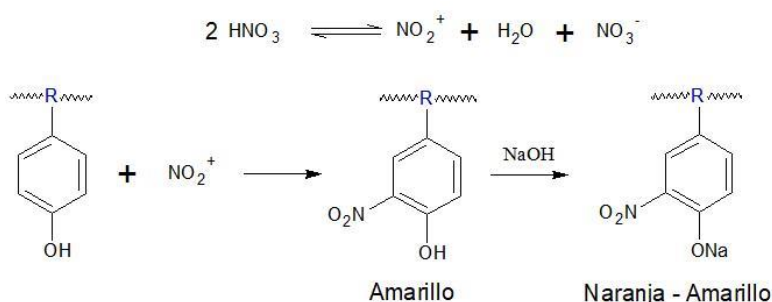
Una prueba muy sencilla que se usa en la detección de proteínas, es la coloración tipo **Biuret**. Cuando se calienta úrea por encima de su punto de fusión, se convierte en un compuesto llamado Biuret, liberando amoníaco.



Este compuesto forma en medio básico un complejo soluble con iones cúprico. Este complejo confiere a la solución una tonalidad púrpura, que es la que se conoce como coloración tipo Biuret. Los péptidos, al presentar el mismo tipo de enlace, dan positiva esta prueba y las proteínas, por tener muchos enlaces peptídicos, dan esa coloración también.



Otra prueba muy utilizada es la **reacción xantoprotéica**, usando como reactivo el ácido nítrico concentrado, que al ser añadido gota a gota a una solución de la proteína, produce desnaturalización y coagulación en la zona de contacto y además aparece una coloración amarilla en la solución, debida a la reacción de la nitración de los núcleos fenólicos presentes en la proteína. Al basificar el medio la coloración se intensifica porque se genera el fenolato correspondiente, muy conjugado.



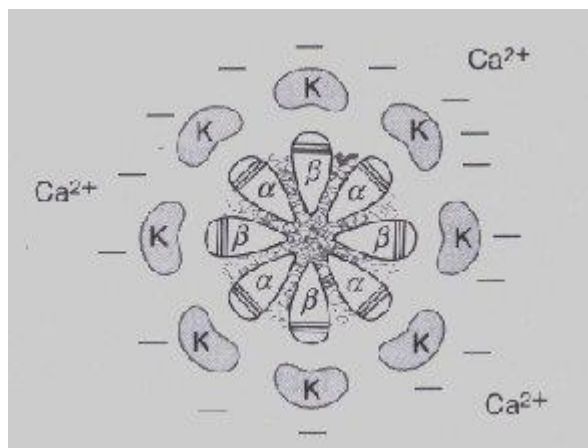
Como ejemplos de proteínas importantes podrían citarse muchos y todas son de interés para los seres vivos: las que propician todos los procesos químicos vitales son las enzimas, las que regulan los equilibrios endocrinos son las hormonas, etc., todas ellas globulares. La piel, el pelo, las paredes de los órganos, etc., son proteínas fibrosas. En la experiencia de laboratorio se utilizarán las proteínas de la leche como ejemplo de esta familia, ya que esta es muy conocida y de consumo diario y además es de especial interés por sus características primordiales como alimento. Es por ello que, en el orden de importancia dentro de la cadena que sostiene la vida en el planeta, las glándulas mamarias vienen inmediatamente después de las células capaces de realizar el proceso fotosintético. La leche es recomendable para personas de todas las edades, ya que es muy completa. Incluye ya carbohidratos (lactosa), lípidos (nata o mantequilla), vitaminas (cofactores o enzimas que no pueden ser sintetizados por el organismo, como la A, el complejo B, la D, la K, etc.), minerales (calcio, potasio, sodio, fósforo, etc.) y proteínas que incluyen todos los aminoácidos esenciales. Lo único verdaderamente importante para la dieta, que no está presente en la leche, es la vitamina C y el hierro.

Las proteínas de la leche son globulares y por lo tanto se solubilizan en agua, formando suspensiones coloidales. Existen tres tipos: **caseínas, lactoglobulinas y lactalbúminas**.

Las caseínas son fosfoproteínas, dado que poseen grupos fosfatos unidos a las cadenas de los grupos R de los diversos aminoácidos que las constituyen. Realmente la unidad de caseína está formada por tres subunidades similares entre sí:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  - caseínas, que se ordenan en una forma más o menos definida. Difieren entre sí en los pesos moleculares y en la cantidad relativa de grupos fosfato:

- ✓  $\alpha$ -Caseína:  $27 \times 10^3$  g/mol; 9 grupos fosfato por molécula.
- ✓  $\beta$ -Caseína:  $24 \times 10^3$  g/mol; 4.5 grupos fosfato por molécula.
- ✓  $\kappa$ -Caseína:  $8 \times 10^3$  g/mol; 1.5 grupos fosfato por molécula.

En la leche esta proteína está como su sal cálcica y en una distribución micelar. Ni la  $\alpha$  ni la  $\beta$  son solubles en medio acuoso pero si presentan mutua afinidad, mientras que la  $\kappa$  si se relaciona más con el medio y por ello en el centro de la micela están las dos primeras, rodeadas por la última que se sitúa en la superficie micelar. La razón de este ordenamiento está en que esta unidad se asocia con los iones calcio para formar el caseinato correspondiente y, siendo el fosfato de calcio muy insoluble y las  $\alpha$  y  $\beta$ -caseínas muy ricas en grupos fosfato y de pesos moleculares muy altos, no podrían estabilizarse en solución, pero como la  $\kappa$  es más pequeña y con menor contenido de fosfatos, si puede solubilizarse y forma la región que rodea el centro micelar, solvatándose adecuadamente para constituir así la solución coloidal.



Su punto isoeléctrico está a un pH de 4.6 y como el pH de la leche es más alto, la proteína está cargada negativamente, formando la sal de calcio en solución. Al agregar ácido a la leche, la proteína se neutraliza y precipita como un coágulo. Para precipitar los otros dos tipos de proteínas presentes en la leche, habría que acidificar más aún.

### CROMATOGRAFÍA:

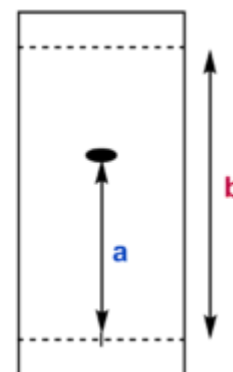
Cromatografía es un método que se utiliza para separar uno o más componentes en una mezcla. Hay tres tipos de cromatografías que son principalmente usados en los laboratorios de química: columna, capa fina y gas. La cromatografía es un método físico en el que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: fase estacionaria (adsorbente) y la fase móvil. La fase móvil es un fluido que se mueve a través de la fase estacionaria. En la técnica de cromatografía la muestra pasa a través de la

fase estacionaria vía la fase móvil. Los componentes se separan de acuerdo al grado de adsorción presente en ellos y la fase estacionaria. En otras palabras, en la fase estacionaria los componentes son adsorbidos y la fase móvil los “des-adsorbe” y arrastra a lo largo de la fase estacionaria. La habilidad de un compuesto para ser adsorbido fuertemente por el adsorbente está relacionada con las fuerzas intermoleculares entre ambos. El solvente debe ser capaz de disolver los compuestos que se van a separar, sin embargo, su capacidad de “des-adsorción” dependerá de la naturaleza del adsorbente y de los compuestos que son movidos.

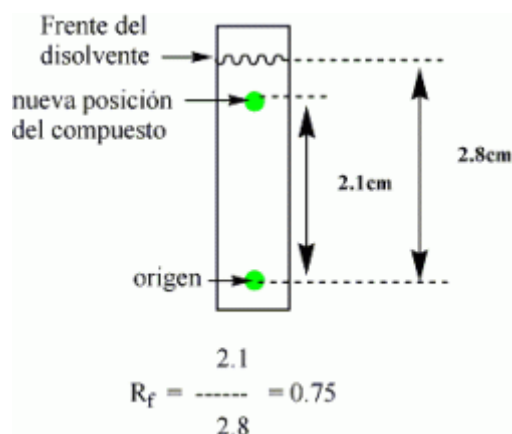
La cromatografía de papel es el tipo de cromatografía más sencilla. Esta técnica puede ser considerada una forma de cromatografía de capa fina. En ella la fase estacionaria es celulosa. Una muestra de una solución se aplica al papel de cromatografía cerca del borde, se coloca en un envase con solvente en el fondo y se deja que el solvente suba por el papel debido a la acción capilar del mismo. Cuando el solvente llega a la muestra, los componentes más solubles en él comienzan a disolverse (des-adsorción) y a desplazarse hacia arriba. Es decir, mientras el solvente avanza por el papel, los componentes más solubles en el solvente y menos adsorbidos por la fase estacionaria tienden a moverse más rápido por el papel, los componentes menos solubles y más fuertemente adsorbidos tienden a moverse más lentamente. Por lo tanto, como cada soluto se adsorbe y “des-adsorbe” en forma diferente, cada uno de ellos se moverá a diferente velocidad y se conseguirá gradualmente la separación deseada.

Para cada soluto se puede determinar el  $R_f$  que corresponde a una medida de cuanto se ha movido un componente relativo al frente del solvente.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (a)}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente (b)}}$$



$R_f$  es constante para una sustancia en particular, su valor depende de las fases estacionaria y móvil y de otros factores experimentales. Este valor puede servir para caracterizar los componentes de una mezcla si las condiciones experimentales se controlan cuidadosamente.



#### 4.- **PROBLEMA:**

¿Se podrá extraer la caseína de una muestra de leche comercial?

#### 5.- **MARCO EXPERIMENTAL:**

##### **MATERIALES:**

- |                            |                        |
|----------------------------|------------------------|
| ✓ Vasos de precipitado     | ✓ Soporte universal    |
| ✓ Equipo de reflujo        | ✓ Espátula             |
| ✓ Plancha de calentamiento | ✓ Papel cromatográfico |
| ✓ Agitador                 | ✓ Goteros              |

##### **SUSTANCIAS:**

- |                            |                    |
|----------------------------|--------------------|
| ✓ Leche descremada         | ✓ Fenol            |
| ✓ Ácido acético al 10%     | ✓ Iodo             |
| ✓ Ácido clorhídrico al 20% | ✓ Ácido nítrico    |
| ✓ Sulfato de cúprico       | ✓ Acetato plúmbico |
| ✓ Hidróxido de sodio       |                    |

### **Medidas de precaución:**

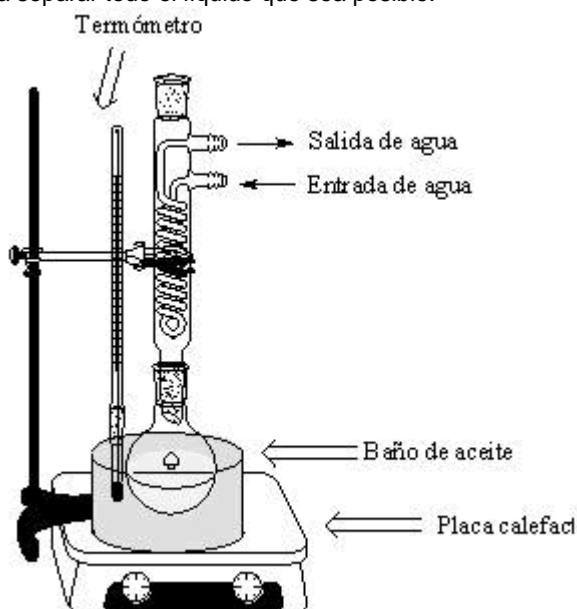


Tenga sumo cuidado durante el reflujo que no exista escape de vapores y se seque el sistema. El fenol y el ácido nítrico deben ser manipulados con sumo cuidado, pues causan serias quemaduras al contacto con la piel.

### **ACTIVIDAD N° 1: Reconocer el tipo de insaturación en el aceite.**

Realice los siguientes pasos:

- 1) Coloque 200 ml. de leche descremada en Beacker de 500 ml. No se debe dejar la leche en reposo durante mucho tiempo antes de utilizarla, ya que la lactosa puede convertirse lentamente en ácido láctico, aunque se guarde en la nevera.
- 2) Caliente la leche hasta aproximadamente los 40° C y añada gota a gota una disolución de ácido acético diluido (1 volumen de ácido acético glacial en 10 volúmenes de agua), con un gotero.
- 3) Agite continuamente la mezcla con una varilla de vidrio durante todo el proceso de adición. Continúe añadiendo ácido acético diluido hasta que no precipite más caseína. Debe evitarse un exceso de ácido porque puede hidrolizarse parte de la lactosa. Agitar la caseína hasta que se forma una gran masa amorfa.
- 4) Separe la caseína con ayuda de una varilla o espátula y colócala en otro vaso.
- 5) Filtre la masa de caseína al vacío para separar todo el líquido que sea posible.
- 6) Presione la caseína con una espátula durante la operación de filtrado.
- 7) La densidad de la leche es de 1,03 g/ml. Calcular el porcentaje de caseína aislada.
- 8) Monte un aparato de reflujo siguiendo las indicaciones del docente, usando un balón de 100 ml. Coloque el balón 0.5 g de caseína, 20 ml de HCl al 20% y un agitador magnético.
- 9) Caliente a reflujo suave por 35 minutos.
- 10) Si se observa color en la solución, agregue carbón activado y filtre.
- 11) Realice la prueba de Biuret al filtrado para determinar si la hidrólisis ha sido completa. Si quedan restos de proteínas, agregue 5 ml de HCl concentrado y se refluja por 15 min más. Se repite la prueba de Biuret hasta que se obtenga un resultado negativo.
- 12) Concentre la solución hasta reducir su volumen a la mitad, para realizar con ella los experimentos restantes.



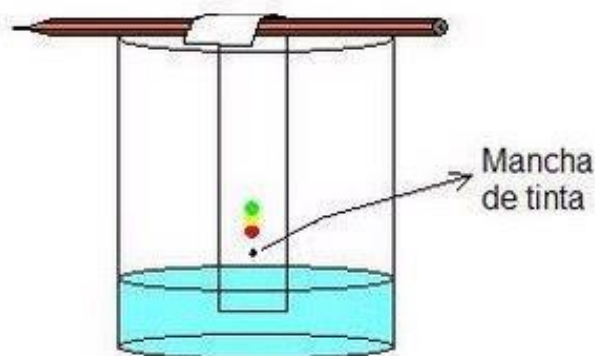
### **ACTIVIDAD N° 2: Cromatografía.**

Realice los siguientes pasos:

- 1) Agregue en un frasco de boca ancha solución acuosa de fenol al 30% de manera tal que no se salpiquen las paredes del frasco. La altura del líquido dentro de la cámara debe ser de 1 cm.



- 2) Tome la cinta de papel que le entregará su profesor y trace a unos 2 cm del borde una raya con lápiz (línea de origen).



- 3) Sobre la línea trazada siembre la muestra de la hidrólisis colocando un pequeño punto del mismo con un capilar.  
 4) Coloque el papel dentro de la cámara de desarrollo, tape y deje desarrollar el cromatograma.  
 5) Saque el cromatograma, marque el frente del disolvente y deje secar al aire.  
 6) Si no se observan las manchas correspondientes, coloque en una estufa a aproximadamente 100 °C o coloque en una cámara de iodo.  
 7) Determine los Rf e intente

identificar los aminoácidos presentes en la mezcla de la hidrólisis de la caseína, listados a continuación:

Compuesto	Rf	Porcentaje aproximado
Ácido glutámico	0.40	22.4
Prolina	0.85	10.9
Leucina	0.79	8.8
Glisina	0.53	7.9
Serina	0.43	7.4
Valina	0.75	6.9
Ácido aspártico	0.32	6.8
Tirosina	0.62	6.1

### **ACTIVIDAD N° 3: Propiedades anfotéricas.**

Realice los siguientes pasos:

- 1) Coloque 0.1 g de caseína en un beacker y adicione 5 ml de agua destilada.
- 2) Adicione 2 ml de NaOH al 10%. Agite vigorosamente.
- 3) Mida el pH.
- 4) Separe 2 ml de esta solución para usarla en el siguiente experimento.
- 5) Al resto agréguele HCl concentrado gota a gota y con agitación midiendo el pH cada vez.
- 6) Complete la adición de un total de 4 ml de HCl concentrado.

### **ACTIVIDAD N° 4: Prueba de biuret.**

Realice los siguientes pasos:

- 1) A la solución guardada del experimento anterior agréguele unas gotas de CuSO<sub>4</sub> al 2% observando la coloración que se produce.

### **ACTIVIDAD N° 5: Precipitación con metales pesados.**

Realice los siguientes pasos:

- 1) Coloque 0.1 g de caseína en un beacker y adicione 3 ml de agua destilada.
- 2) Adicione 2 ml de NaOH al 10%. Agite vigorosamente.
- 3) Agregue unas gotas de solución de acetato plúmbico.

### **ACTIVIDAD N° 6: Reacción xantoprotéica.**

Realice los siguientes pasos:

- 1) Coloque 0.1 g de caseína en un beacker y adicione 3 ml de agua destilada.
- 2) Adicione ácido nítrico concentrado gota a gota, observando los cambios que se producen.
- 3) Basifique con NaOH al 10% y observe si hay alguna variación..

❖ **Aislamiento de la lactosa: (opcional)**

- 1) Añadir, 5 g de carbonato de calcio en polvo al primer vaso (que contiene el líquido del que se ha separado la caseína que se hizo en el experimento 1).
- 2) Agitar esta mezcla durante unos minutos
- 3) Calentar la mezcla anterior a ebullición suave durante aproximadamente 10 minutos. Esto causará la precipitación casi completa de las albúminas (proteínas del suero).
- 4) Filtrar la mezcla caliente al vacío para separar las albúminas precipitadas y el carbonato de calcio que aún quede.
- 5) Concentrar el filtrado (transparente), en un vaso de boca ancha de 600 ml. con un mechero Bunsen, hasta aproximadamente 30 ml. Utilizar varias varillas para ayudar a conseguir una ebullición homogénea y evitar las salpicaduras que se producirían al ir aumentando el precipitado.
- 6) Añadir 175 ml de etanol del 95% (lejos de cualquier llama) y 1 ó 2 g de carbón activo a la disolución caliente.
- 7) Después de haberlo mezclado todo bien, filtrar la solución caliente al vacío. El filtrado debe ser transparente. El filtrado puede enturbiarse debido a la cristalización rápida de la lactosa, después de la filtración al vacío.
- 8) Pasar la disolución a un matraz Erlenmeyer y dejarla reposar durante la noche o hasta que se inicie el siguiente período de trabajo. En algunos casos, se requieren varios días para que la cristalización haya finalizado. La lactosa cristaliza en la pared y en el fondo del matraz.
- 9) Desalojar los cristales y filtrarlos al vacío.
- 10) Lavar el producto con unos pocos mililitros de etanol acuoso frío al 25 %. La lactosa cristaliza con una molécula de agua,  $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$
- 11) Pesar el producto cuando esté completamente seco.
- 12) La densidad de la leche es de 1,03 g/ml. Con este valor, calcular el porcentaje de lactosa en la leche



## **6.- RECOLECCIÓN DE DATOS**

**Anote sus observaciones de cada uno de los experimentos realizados:**

➤ Actividad N° 1

➤ Actividad N° 2

➤ Actividad N° 3

➤ Actividad N° 4

➤ Actividad N° 5

➤ Actividad N° 6

## **7.- ANÁLISIS DE RESULTADOS**

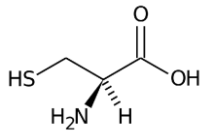
Responda las siguientes cuestiones, justificando sus respuestas.

1.- Calcule el porcentaje de caseína presente en la muestra de leche. (2 Puntos)

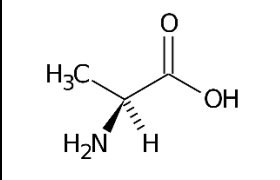
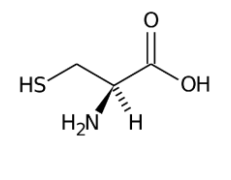
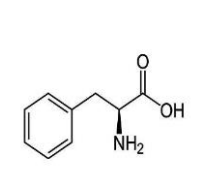
2.- ¿Cuáles aminoácidos están presentes en la muestra de caseína aislada? (1 Punto)

3.- La digestión de las proteínas no puede llevarse a cabo en ausencia de agua. ¿Por qué? (1 Punto)

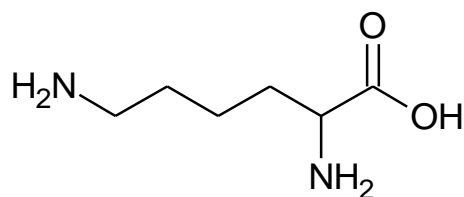
4.- El color característico del cabello se debe a la queratina, proteína que contiene al aminoácido cisteína, cuya fórmula estructural se muestra en la figura. ¿Qué elemento entre sus responsables crees responsable del color? (1 Punto)



5.- ¿Cuál de los siguientes aminoácidos espera usted que sea más soluble en agua? (2 Puntos)

Alannina	Cisteína	Fenilalanina
 <p>The image shows the chemical structure of Alanine. It consists of a central alpha-carbon atom bonded to a hydrogen atom (H) on a dashed wedge, an amino group (H<sub>2</sub>N) on a solid wedge, a methyl group (H<sub>3</sub>C) to the left, and a carboxyl group (COOH) to the right.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Cysteine. It consists of a central alpha-carbon atom bonded to a hydrogen atom (H) on a dashed wedge, an amino group (H<sub>2</sub>N) on a solid wedge, a carboxyl group (COOH) to the right, and a side chain (-CH<sub>2</sub>-SH) to the left.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Phenylalanine. It consists of a central alpha-carbon atom bonded to a hydrogen atom (H) on a dashed wedge, an amino group (NH<sub>2</sub>) on a solid wedge, a carboxyl group (COOH) to the right, and a side chain (-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) to the left, where C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> is a benzene ring.</p>

6.- El aminoácido lisina (Lys), presenta valores de pKa de 2,18; 8,95 y 10,79.



✓ Escriba las reacciones ácido-base que corresponden a cada uno de estos valores de pKa. (2 Puntos).

✓ Calcule el punto isoeléctrico. (2 Puntos).

Item	% (Puntos)	Sí	No	Calificación
<b>Prelaboratorio</b>	<b>25% (5 Pts.)</b>			
<b>Uso de la bata de laboratorio</b>	<b>5% (1 Pto.)</b>			
<b>Materiales de trabajo pedidos para cada práctica</b>	<b>5% (1 Pto.)</b>			
<b>Trabajo en el equipo de laboratorio</b>	<b>5% (1 Pto.)</b>			
<b>Carpeta de laboratorio</b>	<b>5% (1 Pto.)</b>			
<b>Guía</b>	<b>55% (11 Pts.)</b>			
<b>Total</b>	<b>100% (20 Pts.)</b>			