

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Materiais**

Os materiais abaixo foram calibrados por laboratórios acreditados, internos ou externos, como indicado em cada caso. A partir dos certificados de calibração de cada material (Apêndice 9.1), as correções foram calculadas e aplicadas onde pertinente. Outros equipamentos utilizados tais como pHmetro, estufas, centrífugas e autoclave, os quais influenciariam de maneira indireta nos resultados, foram apenas verificados.

#### **4.1.1 Vidrarias**

- Balão volumétrico com capacidade de 25 mL, n° de identificação 3, certificado VOL- 004/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 50 mL, n° de identificação 1, certificado VOL- 007/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 50 mL, n° de identificação 2, certificado VOL- 003/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 50 mL, n° de identificação 3, certificado VOL- 005/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 50 mL, n° de identificação 4, certificado VOL- 008/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 50 mL, n° de identificação 5, certificado VOL- 006/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 100 mL, n° de identificação 1, certificado VOL- 011/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 100 mL, n° de identificação 3, certificado VOL- 012/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 100 mL, n° de identificação 4, certificado VOL- 010/06;
- Balão volumétrico com capacidade de 250 mL, n° de identificação 3, certificado VOL- 024/06;

- Balão volumétrico com capacidade de 1000 mL, n° de identificação 2, certificado VOL- 009/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 1 mL, n° de identificação 3, certificado VOL- 094/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 1 mL, n° de identificação 5, certificado VOL- 020/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 1 mL, n° de identificação 6, certificado VOL- 014/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 1 mL, n° de identificação 8, certificado VOL- 013/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 1 mL, n° de identificação 9, certificado VOL- 017/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 1 mL, n° de identificação 10, certificado VOL- 016/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 2 mL, n° de identificação 3, certificado VOL- 022/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 2 mL, n° de identificação 5, certificado VOL- 093/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 2 mL, n° de identificação 6, certificado VOL- 021/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 5 mL, n° de identificação 8, certificado VOL- 018/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 5 mL, n° de identificação 9, certificado VOL- 092/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 10 mL, n° de identificação 5, certificado VOL- 015/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 10 mL, n° de identificação 7, certificado VOL- 019/06;
- Pipeta graduada com capacidade de 20 mL, n° de identificação 3, certificado VOL- 095/06;
- Bureta graduada com capacidade de 25 mL, n° de identificação 1, certificado VOL- 023/06.

A calibração das vidrarias foi feita segundo a norma ABNT NBR11588 (ABNT, 1989), cujo método é baseado na determinação do volume de água contido ou transferido pela vidraria volumétrica. Tal volume de água é obtido a partir da determinação de sua massa e sua massa específica a uma determinada temperatura, geralmente 20 °C.

#### **4.1.2 Equipamentos**

- Balança com capacidade de 210 g, fabricante Ohaus, n° de identificação D2641118300117, certificado DIMCI 0370/2004;
- Balança com capacidade de 3000 g, fabricante Mettler Toledo, n° de identificação 1115252402, certificado DIMCI 0227/2005;
- Cronômetro digital, fabricante Cassio, n° de identificação PUC03, certificado F096/2003;
- Termômetro digital, fabricante Minipa, n° de identificação TD520001816, certificado TE-1397/04.

As balanças foram calibradas pelo Laboratório de Massa (LAMAS) do Inmetro, registrando-se o valor da pesagem indicado pelas mesmas após a aplicação do padrão de referência (ou combinação de padrões) de valor nominal correspondente a cada ponto de calibração.

O cronômetro foi calibrado pelo Laboratório de Metrologia – LABELO/PUCRS, através de comparação direta com relógio padrão.

A calibração do termômetro digital foi feita pelo Instituto Fluminense de Metrologia (IFM). O método baseia-se na comparação direta a instrumentos de característica padrão, através de um meio termostático.

Outros equipamentos utilizados tais como pHmetro, estufas, centrífugas, agitador de frascos e autoclave foram verificados conforme Apêndice 9.2.

#### **4.2 Reagentes**

A goma arábica utilizada foi fornecida pela ISO FAR, assim como o ágar utilizado no meio sólido para manutenção da cepa. Também para o meio sólido e para os meios líquidos foram utilizados extrato de lêvedo e peptona fornecidos

pela Oxoid e óleo de oliva da marca Serrata. A Riedel-deHaën forneceu a alumina neutra para a purificação do óleo. Glicose, hidróxido de sódio, biftalato de potássio, etanol e acetona foram fornecidos pela Vetec. Outros reagentes em grau analítico (éter etílico, éter de petróleo, fosfato de potássio monobásico e dibásico) foram obtidos da Quimex.

### 4.3 Planejamento Experimental

Para o planejamento dos experimentos foi utilizado o método D-optimal (Aguiar e col., 1995), uma vez que algumas combinações de concentrações nas faixas escolhidas não seriam praticáveis, tornando a região experimental irregular. A variável a otimizar, ou resposta ( $y$ ), correspondeu à atividade lipásica, sendo função de três fatores operacionais: a concentração da fonte de carbono ( $C$ ), a concentração da fonte de nitrogênio ( $N$ ) e a concentração de inóculo ( $I_0$ ).

O planejamento foi feito de modo a otimizar a possibilidade de ajustes dos parâmetros no seguinte modelo de segunda ordem:

$$y = \beta_0 + \beta_1\xi_1 + \beta_2\xi_2 + \beta_3\log\xi_3 + \beta_{11}\xi_1^2 + \beta_{22}\xi_2^2 + \beta_{33}(\log\xi_3)^2 + \beta_{12}\xi_1\xi_2 + \beta_{13}\xi_1\log\xi_3 + \beta_{23}\xi_2\log\xi_3 \quad (\text{Equação 4.1})$$

onde  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{12}, \beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  representam os coeficientes de regressão, e  $\xi_1, \xi_2, \xi_3$  representam as variáveis codificadas  $C, N$  e  $I_0$ , respectivamente. Através das equações 4.2, 4.3 e 4.4 é possível relacionar os valores reais dos três fatores estudados com os valores codificados.

$$\xi_1 = \frac{C(\%) - 3,0}{2,5} \quad (\text{Equação 4.2})$$

$$\xi_2 = \frac{N(\%) - 0,7}{0,5} \quad (\text{Equação 4.3})$$

$$\xi_3 = \frac{I_0(\text{mg/mL}) - 5,25}{4,75} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Devido ao fato do fator  $I_0$  apresentar comportamento exponencial, foi empregado o logaritmo na equação 4.1.

Para cada fator foram empregados três níveis conforme apresentado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Níveis empregados para os fatores C, N e  $I_0$ .

C		N		$I_0$	
Real (%)	Codificado $\xi_1$	Real (%)	Codificado $\xi_2$	Real (mg/mL)	Codificado $\xi_3$
0,5	-1	0,2	-1	0,5	-1
3,0	0	0,7	0	2,2	0
5,5	+1	1,2	+1	10	+1

A Tabela 4.2 apresenta os 10 experimentos planejados, utilizando o “Statistical toolbox” do programa Matlab (7.0).

Tabela 4.2 – Planejamento dos experimentos através do método D-optimal C, N e  $I_0$  expressos como valores codificados.

Experimento	C	N	$I_0$
1	+1	0	0
2	+1	-1	+1
3	+1	+1	-1
4	-1	+1	0
5	+1	-1	-1
6	+1	+1	+1
7	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1
9	-1	0	+1
10	0	0,2426	0,4746

Os coeficientes do modelo foram estimados pelo método dos mínimos quadrados através do programa Microsoft Excel (2004). O mesmo programa foi utilizado para outros cálculos e análise gráfica dos resultados obtidos.

#### 4.4 Microrganismo

Foi utilizada a cepa de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682), isolada de um estuário na Baía de Guanabara (Hagler e Mendonça-Hagler, 1981).

#### 4.5 Meios de Cultura

##### 4.5.1 Meios sólidos

Os meios sólidos (MS) utilizados para manutenção da cepa a 4 °C possuíam a seguinte composição: glicose 2% (m/v), extrato de lêvedo 0,5% (m/v), peptona 1% (m/v) e ágar 2,5% (m/v), em pH 6,0 (Pereira-Meirelles, 1997).

##### 4.5.2 Meios líquidos

A Tabela 4.3 apresenta a composição dos meios de cada experimento. Todos os meios apresentavam, no início do experimento, pH 6,0 e volume de 400 mL em frascos tipo Erlenmeyer de 2 L.

Tabela 4.3 – Composição dos meios líquidos utilizados para produção de lipases. Valores em %.

Experimento	Óleo de oliva purificado (C)	Peptona (N)	Extrato de Lêvedo
Pré-inóculo	1,0	0,64	0,1
1	5,5	0,7	0,1
2	5,5	0,2	0,1
3	5,5	1,2	0,1
4	0,5	1,2	0,1
5	5,5	0,2	0,1
6	5,5	1,2	0,1
7	0,5	0,2	0,1
8	0,5	0,2	0,1
9	0,5	0,7	0,1
10	3,0	0,82	0,1

## 4.6 Produção da enzima

Foram feitos repiques das células de *Y. lipolytica* a partir da cultura estoque para os meios de manutenção (MS), os quais foram incubados por 48 horas, a 29 °C. Decorridas as 48 horas, as células foram ressuspensas em aproximadamente 10 mL de água deionizada estéril e inoculadas no meio líquido (pré-inóculo). O frasco Erlenmeyer foi então colocado no agitador Tecnal TE-422 (Figura 4.1) sob agitação de 160 rpm, a 29 °C por 24 horas. Após este tempo, o meio foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, separando-se as células do sobrenadante, as quais foram ressuspensas em água deionizada estéril e inoculadas nos meios apresentados na Tabela 4.3. Os frascos Erlenmeyers foram colocados no agitador de frascos, nas mesmas condições do pré-inóculo. A concentração inicial de células para cada experimento encontra-se na Tabela 4.4. Aliquotas nos diferentes tempos de cultivo foram retiradas do meio de cultura e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. As células foram então separadas do sobrenadante.

Tabela 4.4 – Concentração inicial de células para cada experimento.

Experimento	I <sub>0</sub> (mg/mL)
1	2,2
2	10
3	0,5
4	2,2
5	0,5
6	10
7	10
8	0,5
9	10
10	4,6

O diagrama apresentado na Figura 4.2 mostra um resumo do procedimento de produção de lipases por células de *Yarrowia lipolytica*, utilizadas neste trabalho.



(a)



(b)

Figura 4.1 – (a) Agitador de frascos utilizado em todos os cultivos. (b) Frascos Erlenmeyers contendo os meios inoculados.

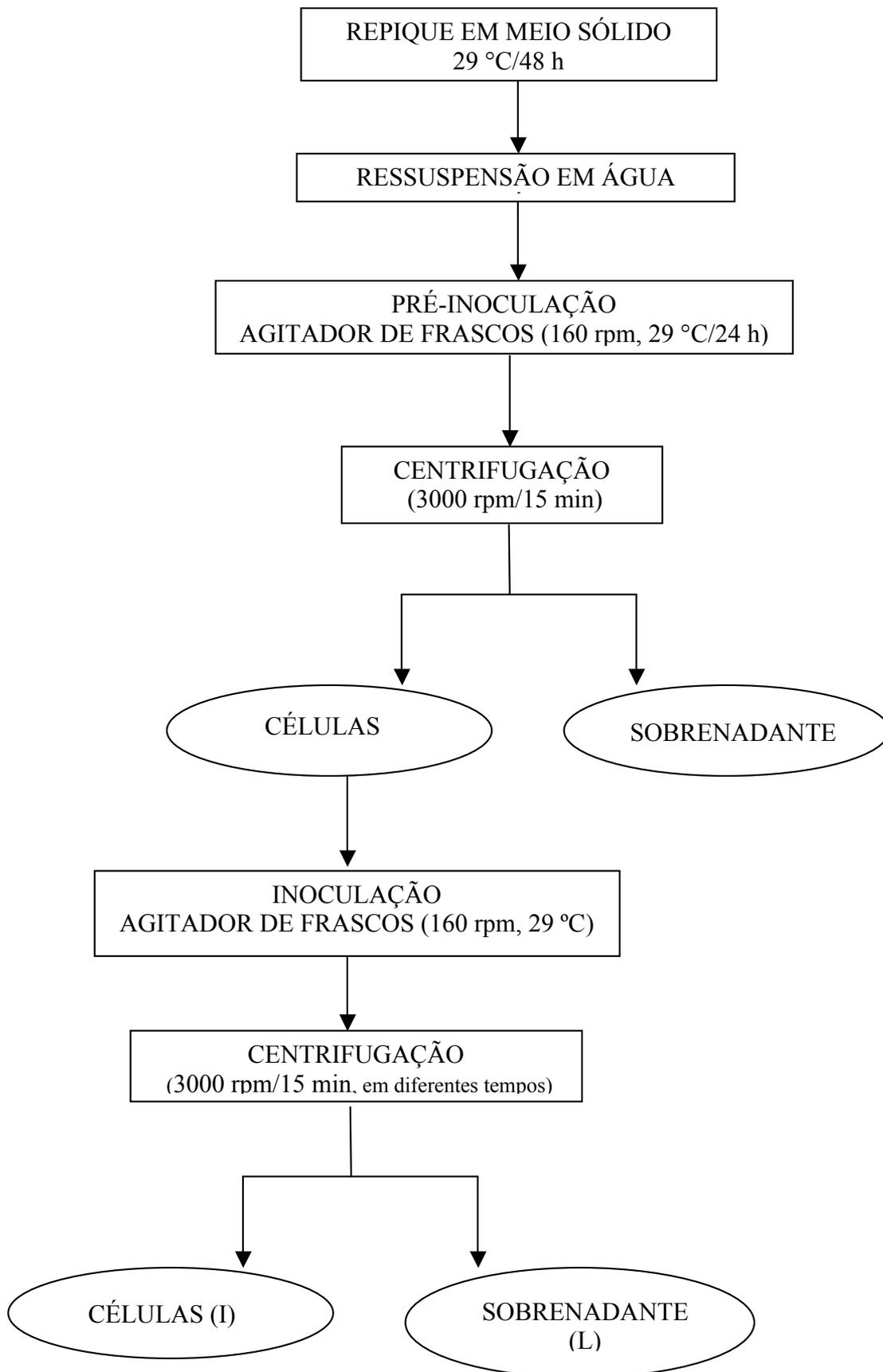


Figura 4.2 – Diagrama do processo de produção de lipases.  
Legenda: I = Biomassa, L = lipase

## 4.7

### Purificação do óleo de oliva

O óleo de oliva foi purificado em coluna de alumina neutra, de diâmetro de 3 cm, protegida da luz, aplicando-se nesta uma solução a 0,5% (v/v) de óleo em mistura de éter etílico e éter de petróleo (1:10), com fluxo aproximado de 1 mL/min. Após a purificação, o óleo foi coletado e mantido sob agitação ao abrigo da luz, para a evaporação dos solventes (Pinheiro, 1992). O índice de acidez do óleo foi determinado antes e depois da purificação, como descrito no item 4.8.

## 4.8

### Determinação do índice de acidez do óleo de oliva

O índice de acidez (IA) do óleo de oliva foi determinado conforme a descrição da Farmacopéia Brasileira (4ª edição). Foram pesados 10 g de óleo de oliva e dissolvidos em 10 mL de etanol. A mistura foi titulada com NaOH 0,1 mol/L, usando fenolftaleína como indicador, sob agitação vigorosa.

Por definição, o índice de acidez é o número de miligramas de hidróxido de potássio necessários para a neutralização de 1 grama de substância graxa.

Logo:

$$IA = \frac{V \times M \times 5,6}{m} \quad (\text{Equação 4.5})$$

onde, IA é o índice de acidez, V é o volume de NaOH consumido no ensaio, M é a concentração em quantidade de matéria do NaOH e m é a massa de amostra analisada.

## 4.9

### Métodos analíticos

#### 4.9.1

##### Quantificação do crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado pela determinação da absorvância a 580 nm e posterior conversão em concentração celular (mg p.s.cel./mL), através da curva de correlação previamente construída.

## 4.9.2 Determinação da atividade lipásica

A determinação da atividade lipásica foi feita pelo método titulométrico (Dellamora-Ortiz e col., 1997). Reatores incubados a 37 °C foram utilizados, sob agitação constante, os quais continham como substrato 2,5 mL de emulsão de óleo de oliva 20% (v/v) em goma arábica 5% (m/v) e 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,0, previamente aquecidos por 5 minutos. Após este tempo, a reação era iniciada pela adição de 1 mL da preparação enzimática (sobrenadante citado no item 4.6) e paralisada após 15 minutos com adição de 5 mL de mistura de etanol e acetona (1:1). O branco foi preparado por adição da mistura etanol-acetona ao meio reacional, antes da adição da preparação enzimática.

Os ácidos graxos formados foram então titulados contra NaOH 0,01 mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador.

*Uma unidade de atividade lipásica (1U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições de ensaio.*

## 4.10 Estimativa da incerteza de medição da atividade lipásica

A estimativa da incerteza de medição relacionada à atividade lipásica foi calculada com base no GUM (INMETRO, 2003a) e no Guia CG 4 (EURACHEM/CITAC, 2000).

A equação 4.6 fornece a atividade lipásica U (em μmol/min.L):

$$U = \frac{M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 10^6}{t \times V_A} \quad (\text{Equação 4.6})$$

Nesta equação:

$M_{\text{NaOH}}$  é a concentração em quantidade de matéria da solução de NaOH, em mol/L;

$V_{\text{NaOH}}$  é o volume adicionado de NaOH, em mL;

t é o tempo da reação, em min;

$V_A$  é o volume de amostra adicionado, em mL.

A incerteza padrão combinada,  $u_c(U)$ , associada a uma medida de atividade lipásica é dada pela equação 4.7:

$$u_c^2(U) = (c_{M_{\text{NaOH}}} \times u(M_{\text{NaOH}}))^2 + (c_{V_{\text{NaOH}}} \times u(V_{\text{NaOH}}))^2 + (c_t \times u(t))^2 + (c_{V_A} \times u(V_A))^2 \quad (\text{Equação 4.7})$$

Os coeficientes de sensibilidade  $c_{M_{\text{NaOH}}}$ ,  $c_{V_{\text{NaOH}}}$ ,  $c_t$  e  $c_{V_A}$  foram calculados conforme a equação 2.11.

A Figura 4.3 apresenta o diagrama de causa e efeito com todas as componentes consideradas para os cálculos. Abaixo são fornecidos valores para as incertezas padronizadas  $u(M_{\text{NaOH}})$ ,  $u(V_{\text{NaOH}})$ ,  $u(t)$  e  $u(V_A)$ , ou são explicados os procedimentos para obtê-los, sempre de acordo como o GUM (INMETRO, 2003a) e com o Guia CG 4 (EURACHEM/CITAC, 2000). São apresentados também os divisores apropriados.

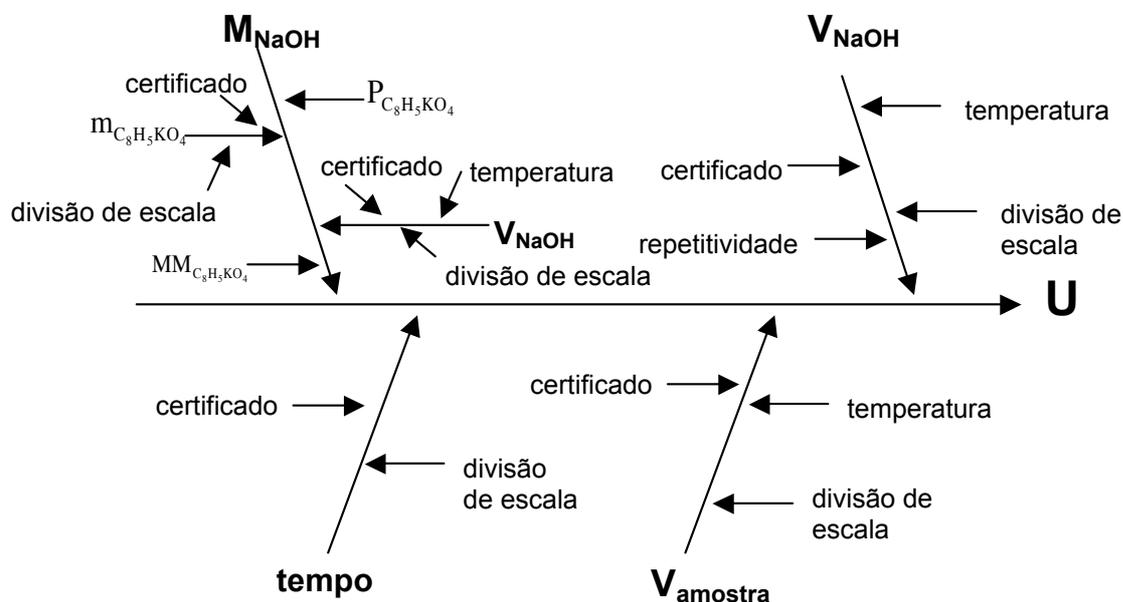


Figura 4.3 – Diagrama de causa e efeito com as componentes da incerteza da atividade lipásica ( $U$ )

#### 4.10.1

#### Incerteza padronizada da concentração em quantidade de matéria da solução de NaOH

A concentração em quantidade de matéria da solução de NaOH, em mol/L, é dada pela equação 4.8:

$$M_{\text{NaOH}} = \frac{m_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4} \times P_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}}{\text{MM}_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4} \times V_{\text{NaOH}}} \quad (\text{Equação 4.8})$$

Nesta equação:

$m_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}$  é a massa de biftalato de potássio, em g;

$P_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}$  é a pureza do biftalato de potássio fornecida pelo fabricante;

$\text{MM}_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}$  é a massa molar do biftalato de potássio, em g/mol;

$V_{\text{NaOH}}$  é o volume de NaOH adicionado, em L.

A incerteza padrão combinada,  $u_c(M_{\text{NaOH}})$ , associada à concentração em quantidade de matéria da solução de NaOH é dada pela equação 4.9:

$$u_c^2(M_{\text{NaOH}}) = (c_{m_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}} \times u(m_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}))^2 + (c_{P_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}} \times u(P_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}))^2 + (c_{\text{MM}_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}} \times u(\text{MM}_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}))^2 + (c_{V_{\text{NaOH}}} \times u(V_{\text{NaOH}}))^2 \quad (\text{Equação 4.9})$$

Os coeficientes de sensibilidade  $c_{m_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}}$ ,  $c_{P_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}}$ ,  $c_{\text{MM}_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4}}$  e  $c_{V_{\text{NaOH}}}$  foram calculados conforme a equação 2.11.

As incertezas padronizadas  $u(m_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4})$ ,  $u(P_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4})$ ,  $u(\text{MM}_{\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4})$  e  $u(V_{\text{NaOH}})$ , associadas a todas as grandezas medidas  $x_i$  também aparecem na equação 4.9. Abaixo são fornecidos valores para tais incertezas, ou são explicados os procedimentos para obtê-los, sempre de acordo como o GUM (INMETRO, 2003a) e com o Guia CG 4 (EURACHEM/CITAC, 2000). São apresentados também os divisores apropriados.

-  $u(m_{C_8H_5KO_4})$

Considerou-se duas fontes de incerteza para  $m_{C_8H_5KO_4}$ : (a) correção de certificado, para a qual foi utilizado o valor indicado no certificado da balança utilizada, e o divisor corresponde ao fator de abrangência, também lá indicado; (b) metade da menor divisão da balança. O divisor aqui é  $\sqrt{3}$ , pois foi assumida uma distribuição retangular.

O coeficiente de sensibilidade para todas as fontes é igual a 1,0.

A incerteza padrão combinada  $u_c(m_{C_8H_5KO_4})$  foi calculada conforme a equação 2.10. O número de graus de liberdade efetivos ( $\nu_{eff}$ ) foi obtido através da equação 2.12.

-  $u(P_{C_8H_5KO_4})$

A pureza do biftalato de potássio informada pelo fabricante é 1,0000 com incerteza expandida de 0,0005. Assumiu-se uma distribuição retangular e o divisor neste caso é  $\sqrt{3}$ . Considerou-se  $\nu \rightarrow \infty$ .

-  $u(MM_{C_8H_5KO_4})$

A incerteza padronizada relacionada à  $MM_{C_8H_5KO_4}$  foi calculada a partir das incertezas expandidas de cada elemento do biftalato de potássio, as quais são informadas pela IUPAC (Tabela 4.5), multiplicadas pelo número de átomos (n). O divisor considerado foi  $\sqrt{3}$ .

A incerteza padrão combinada  $u_c(MM_{C_8H_5KO_4})$  foi calculada conforme a equação 2.10. Considerou-se  $\nu \rightarrow \infty$ .

-  $u(V_{NaOH})$

A incerteza padronizada do volume de NaOH adicionado é apresentada no item 4.10.2.

O coeficiente de sensibilidade para cada elemento é igual a 1,0.

Tabela 4.5 – Incertezas expandidas ( $U$ ) de cada elemento do biftalato de potássio (EURACHEM/CITAC, 2000). Valores em g/mol.

Elemento	$U$	$n$	$U \times n$
C	0,0008	8	0,0064
H	0,00007	5	0,00035
K	0,0003	4	0,0012
O	0,0001	1	0,0001

#### 4.10.2

##### Incerteza padronizada do volume de NaOH adicionado

Considerou-se quatro fontes de incerteza para  $V_{\text{NaOH}}$ : (a) correção de certificado, para a qual foi utilizado o valor indicado no certificado da bureta, e o divisor corresponde ao fator de abrangência, também lá indicado; (b) avaliação tipo A, igual ao desvio padrão da média experimental das diversas medições realizadas. O divisor neste caso é 1; (c) metade da menor divisão da bureta. O divisor aqui é  $\sqrt{3}$ , pois foi assumida uma distribuição retangular; (d) diferença entre a temperatura de calibração da bureta utilizada e a temperatura no momento das medições. A distribuição é retangular e com isso o divisor é  $\sqrt{3}$ . Admitindo-se uma variação de até 5 °C na temperatura, foi possível calcular a variação de volume ( $\Delta V$ ), em mL, através da equação 4.10:

$$\Delta V = V \times \Delta T \times \alpha_v \quad (\text{Equação 4.10})$$

Nesta equação:

$V$  é o volume utilizado, em mL;

$\Delta T$  é a variação de temperatura, em °C;

$\alpha_v$  é o coeficiente de expansão volumétrica para a água, igual a  $2,1 \times 10^{-4} \text{ °C}^{-1}$ .

O coeficiente de sensibilidade para todas as fontes é igual a 1,0.

A incerteza padrão combinada  $u_c(V_{\text{NaOH}})$  foi calculada conforme a equação 2.10. O número de graus de liberdade efetivos ( $\nu_{\text{eff}}$ ) foi obtido através da equação 2.12.

#### **4.10.3 Incerteza padronizada do tempo**

Considerou-se duas fontes de incerteza para t: (a) correção de certificado, para a qual foi utilizado o valor indicado no certificado do cronômetro utilizado, e o divisor corresponde ao fator de abrangência, também lá indicado; (b) metade da menor divisão do cronômetro. O divisor aqui é  $\sqrt{3}$ , pois foi assumida uma distribuição retangular.

O coeficiente de sensibilidade para todas as fontes é igual a 1,0.

A incerteza padrão combinada  $u_c(t)$  foi calculada conforme a equação 2.10. O número de graus de liberdade efetivos ( $\nu_{\text{eff}}$ ) foi obtido através da equação 2.12.

#### **4.10.4 Incerteza padronizada do volume de amostra**

Considerou-se três fontes de incerteza para  $V_A$ : (a) correção de certificado, para a qual foi utilizado o valor indicado no certificado da pipeta utilizada, e o divisor corresponde ao fator de abrangência, também lá indicado; (b) metade da menor divisão da pipeta. O divisor aqui é  $\sqrt{3}$ , pois foi assumida uma distribuição retangular; (c) diferença entre a temperatura de calibração da bureta utilizada e a temperatura no momento das medições. A distribuição é retangular e com isso o divisor é  $\sqrt{3}$ . Admitindo-se uma variação de até 5 °C na temperatura, foi possível calcular a variação de volume ( $\Delta V$ ), em mL, através da equação 4.10.

O coeficiente de sensibilidade para todas as fontes é igual a 1,0.

A incerteza padrão combinada  $u_c(V_A)$  foi calculada conforme a equação 2.10. O número de graus de liberdade efetivos ( $\nu_{\text{eff}}$ ) foi obtido através da equação 2.12.