

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bruna Kuhnen Barni

**Análise de danos ao DNA em leucócitos de agricultores do município de Santo Amaro da
Imperatriz - SC que aplicam pesticidas**

Florianópolis

2022

Bruna Kuhnen Barni

Análise de danos ao DNA em leucócitos de agricultores do município de Santo Amaro da Imperatriz - SC que aplicam pesticidas

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

Florianópolis

2022

RESUMO

A utilização global de pesticidas aumentou continuamente nas últimas décadas. Cerca de 20% dos pesticidas comercializados no mundo são consumidos no Brasil. Em Santa Catarina esse consumo é crescente, sendo atualmente o 10º estado com maior uso de insumos químicos na agricultura por área plantada. A exposição ocupacional aos pesticidas pode causar problemas de saúde, depressão e danos neurológicos, problemas reprodutivos, intoxicação e desenvolvimento de diferentes tipos de câncer. Alguns fatores como falta de conhecimento, mal uso dos produtos ou falta de EPI agravam estes riscos. A técnica do cometa é uma técnica considerada bastante sensível para detectar exposições a agentes genotóxicos, antes da ação do sistema de reparo do organismo, servindo de alerta precoce de aumento do risco de desenvolver doenças relacionadas à exposição. O objetivo deste estudo foi avaliar os índices de dano ao DNA, através da técnica do cometa no sangue periférico de agricultores expostos a agrotóxicos. A amostra foi composta por 25 agricultores do município de Santo Amaro da Imperatriz – SC e 25 indivíduos não expostos, como grupo controle. Neste estudo foram obtidos resultados significativos em relação a quantidade de danos ao DNA entre grupo controle e caso. O grupo caso apresentou uma média de comprimento de cauda do cometa formada por DNA danificado significativamente maior que o grupo controle ($p < 0,001$). Os resultados do presente estudo evidenciam fortemente a instabilidade genômica com a exposição ocupacional de pesticidas em agricultores através do ensaio do cometa, que permite uma análise simples, rápida e sensível aos danos de DNA.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Dano de DNA; Técnica do cometa; agentes mutagênicos; agentes genotóxicos; monitorização ocupacional.

ABSTRACT

The global use of pesticides has increased continuously over the last few decades. About 20% of the pesticides sold in the world are purchased in Brazil. In Santa Catarina, this consumption is increasing, being currently the tenth state with the highest use of chemical inputs in agriculture by planted area. Occupational exposure to pesticides can cause health problems such as damage to treatments, reproductive problems and the development of different types of cancer. Some factors such as lack of knowledge, misuse of products or lack of PPE exacerbate these risks. Comet assay is considered to be a very sensitive technique for detecting exposure to genotoxic agents, before the action of the body's repair system, serving as an early warning of an increased risk of developing exposure-related diseases. The objective of this study was to evaluate the DNA damage rates through the comet assay in the peripheral blood of farmers exposed to pesticides. The sample consisted of 25 farmers from the municipality of Santo Amaro da Imperatriz - SC and 25 non-exposed individuals, as a control group. In this study, significant results were obtained in relation to the amount of DNA damage between the control and case groups. The case group presented an average length of comet tail formed by damaged DNA significantly higher than the control group ($p < 0.001$). The results of the present study strongly evidence the genomic instability with the occupational exposure of pesticides in farmers through the comet assay, which allows a simple, fast and sensitive analysis to DNA damage.

Keywords: Pesticides; DNA damage; comet technique; mutagens; genotoxic agents; occupational monitoring.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
1.1	JUSTIFICATIVA.....	9
1.2	OBJETIVOS	9
1.2.1	Objetivo Geral	9
1.2.2	Objetivos Específicos	9
2	MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	10
2.2	ENSAIO COMETA.....	10
2.2.1	Preparação da lâmina.....	10
2.2.2	Eletroforese.....	11
2.2.3	Coloração.....	11
2.2.4	Leitura das lâminas.....	11
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
2.4	RECURSOS.....	12
3.	RESULTADOS.....	13
3.1	PERFIL DA POPULAÇÃO.....	13
3.2	ENSAIO COMETA.....	14
3.3	COMETA DE SEXO.....	14
3.4	COMETA E IDADE.....	16
3.5	COMETA E TEMPO DE TRABALHO.....	17
4.	DISCUSSÃO	18
	REFERÊNCIAS	20
	ANEXOS.....	23

1 INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas na agricultura tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos anos e a agricultura moderna além de trazer novas técnicas e equipamentos que facilitam as práticas agrícolas, faz o uso indiscriminado de químicos para matar ou controlar pragas e prevenir doenças em plantas, a fim de melhorar a sua produtividade (ALI *et al.*, 2008; HILGERT *et al.*, 2017). Segundo a OPAS – (Organização Pan-Americana da saúde) - substâncias químicas agrícolas matam por ano aproximadamente 193 mil pessoas no mundo.

Cerca de 20% dos pesticidas comercializados no mundo são consumidos no Brasil (FERNANDES *et al.*, 2020). Um levantamento realizado pelo IBAMA em 2017 mostrou os ativos mais utilizados no território nacional, considerando a quantidade de toneladas que foram vendidas nesse mesmo ano. Seriam eles: o Glifosato (173.150,75 ton.), ácido diclorofenoxiacético (57.389,35 ton.), Maconzebe (30.815,09 ton.), Acefato (27.057,66 ton.), Atrazina (24.730,90 ton.) (IBAMA, 2017). O país expandiu aproximadamente 190% desse mercado nos últimos 10 anos, colocando-o assim em primeiro lugar no *ranking* mundial de consumo desde 2008 (LOPES, 2018).

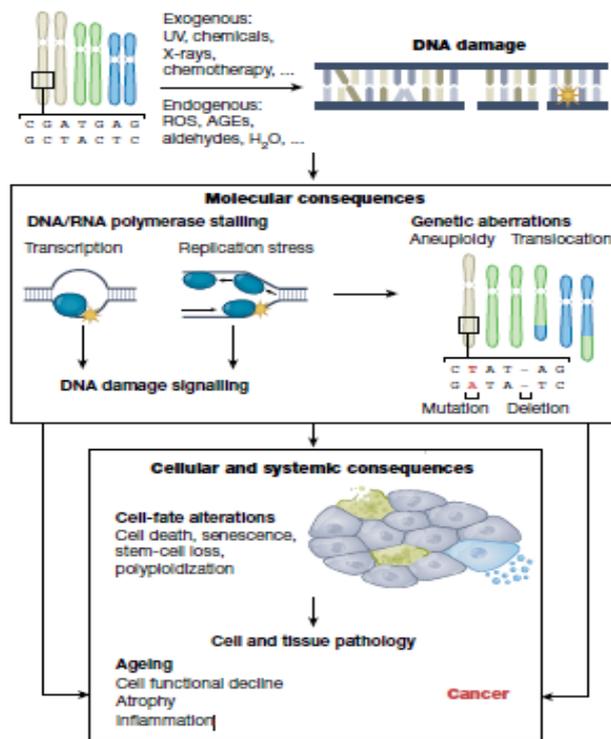
Inúmeros estudos já comprovaram os danos que a exposição aos pesticidas pode causar à saúde humana. Efeitos crônicos e neurológicos, problemas reprodutivos e desenvolvimento de câncer são associados à exposição a pesticidas (BOLOGNESI, 2011). A população em geral apresenta um certo grau de exposição devido a resíduos encontrados em água e alimentos, porém, trabalhadores rurais em empresas do agronegócio, agricultura familiar e fábricas são sem dúvidas os que possuem maior contato com esses produtos e por um período prolongado (SANTA CATARINA, 2013). O grau de intoxicações dessas pessoas pode variar do leve ao grave, isso vai depender dos hábitos de vida, tempo de exposição, toxicidade do produto e quantidades utilizadas (SANTA CATARINA, 2013).

Santa Catarina encontra-se em 10º lugar no ranking brasileiro de consumo de pesticidas por área plantada (PIGNATI *et al.*, 2017). A predominância no estado é da agricultura familiar, que devido às suas características socioeconômicas leva a um menor alcance às informações e tecnologias e conseqüentemente a um aumento no uso direto de pesticidas em plantações (MATTEI, 2016).

O DNA está constantemente sofrendo modificações na sua estrutura tanto por fatores endógenos quanto exógenos, porém as células de defesa do corpo humano possuem um sistema de reparo que diariamente está trabalhando para revertê-las. Quando o sistema não dá conta ou as lesões são mal reparadas e a lesão é irreparável as células são sujeitas a mutações, o que pode induzir a integridade do DNA e instabilidade genômica, acarretando no

desenvolvimento de possíveis cânceres (Vivian F. et al, 2018) (figura 1). Dessa maneira, o uso de pesticidas está diretamente ligado à integridade do genoma e como consequência no aumento de incidência do câncer (DESAULNIERS et al., 2015). Apesar da grande exposição, alguns fatores podem auxiliar na diminuição desses malefícios. Os antioxidantes, por exemplo, estão diretamente ligados na reversão ao dano de DNA (BIANCHI, 1999).

Figura 1 – Dano de DNA.



Fonte: Adaptado de SCHUMACHER; POTHOF; VIJG; HOEIJMAKERS, 2021.

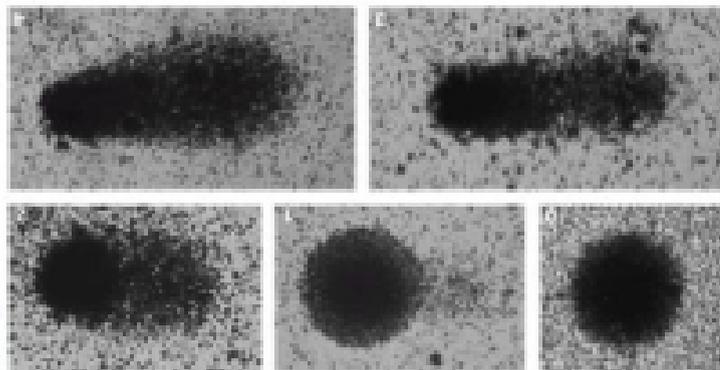
A figura apresenta um esquema de fatores exógenos e endógenos que atuam sobre as células, causando danos moleculares e, quando não removidos pelo sistema de reparo, podem levar a problemas funcionais, envelhecimento, inflamação, e futuramente possíveis cânceres.

Muitas técnicas foram desenvolvidas para monitorar populações expostas a pesticidas, incluindo diferentes marcadores genéticos que auxiliam esse biomonitoramento. A eletroforese em gel de célula única, mais conhecida como ensaio do cometa, é uma ferramenta simples, multifuncional, com alta sensibilidade e amplamente utilizada para medir efeitos prejudiciais de diferentes compostos químicos com potencial de gerar danos ao DNA, visto que a técnica permite mensurar danos ao DNA antes da atuação do sistema de reparo (Kruszewski, 2012).

Na técnica do cometa, as células apresentadas sobre a lâmina de agarose são sujeitas a uma corrente elétrica alcalina que pela força gera uma dispersão dos fragmentos do DNA

livres para fora do núcleo (AZQUETA et al., 2019). No fim desse processo de eletroforese, é possível identificar as células lesionadas por uma espécie de “cauda”, semelhante a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA que migraram para o ânodo da eletroforese (FAIRBAIRN, 1995). As quebras no DNA podem ser de fita simples ou duplas, além de sítios de reparos incompletos, danos álcali-lábeis e/ou *crosslinks* (TICE et al., 2000). A coloração das lâminas é feita com nitrato de prata por ser uma solução de baixo custo, facilidade de análise a partir de um microscópio de luz convencional e possibilita armazená-las por muito tempo (Nadin et al., 2001). As células que permanecem intactas, são apontadas como sem danos aparentes no DNA. Os segmentos gerados a partir dessa eletroforese podem ter variados tamanhos, classificando-os assim em diferentes níveis de danos. O tamanho das caudas está relacionado proporcionalmente com o grau de lesão: quanto maior a cauda maior o dano.

Figura 1 – Resultado das células do ensaio Cometa após coloração de prata



Fonte: Maluf S. W., 2011.

A figura apresenta o comprimento dos segmentos deixados nas células após a eletroforese. Sua classificação varia de 0 a 4 sendo diretamente proporcional à quantidade de dano (0 sem danos e 4, dano máximo).

1.1 JUSTIFICATIVA

A aplicação crescente de pesticidas nas lavouras trouxe o entendimento de que seu uso tem se tornado um problema ambiental e de saúde aos trabalhadores, principalmente aos agricultores e suas famílias por possuírem contato direto com os pesticidas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 objetivo geral

Avaliar os índices de dano ao DNA, através da técnica do cometa no sangue periférico de agricultores expostos a agrotóxicos no município de Santo Amaro - SC.

1.2.2 objetivos específicos:

- Analisar os níveis de dano de DNA em agricultores expostos a pesticidas, por meio da Técnica do Cometa;
- Correlacionar os resultados obtidos com o tempo de trabalho, sexo, idade e hábitos de vida dos trabalhadores;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número do parecer 3.127.656.

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 25 agricultores com exposição a pesticidas por pelo menos 5 anos, do município de Santo Amaro da Imperatriz – SC e 25 indivíduos não expostos, como grupo controle.

Após explicação detalhada dos procedimentos e o aceite dos participantes, assinou-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) e submetidos a um questionário relacionado ao caráter sócio demográfico, hábitos de vida, procedência de alimentos e água, exposição a pesticidas e história clínica e ocupacional (Anexo II).

2.2 ENSAIO COMETA

Este ensaio seguirá de acordo com o protocolo de Singh (NADIN et al., 2001) (Singh, et al., 1988), e será aplicada a partir do sangue heparinizado. Os testes serão em conformidade com o ensaio para amostras in vivo (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003).

2.2.1 Preparação das lâminas

As lâminas com pré cobertura de agarose de ponto de fusão normal (0,15g agarose regular; 10 ml PBS) são preparadas e deixadas prontas para posterior uso.

Preparar a Solução de Lise final (89ml Solução de Lise Mãe, 10 ml DMSO, 1 ml Triton x-100) e armazenar em geladeira. Pipetar em um eppendorf 95µl da mistura de agarose Low Melting (0,07g) e PBS (10 ml), e 5µl da amostra sobre a lâmina com pré cobertura de agarose e cobrir com a lamínula. Depositar essas lâminas em uma “câmara úmida” na geladeira por 5 minutos, retirar a lamínula, e colocar na Solução de Lise (89 ml Solução de Lise Mãe* + 10 ml DMSO + 1 ml Triton x-100) (manter por um período mínimo de duas horas e máximo de 14 dias).

*Lise mãe: (NaCl 2,5M 146,1g +EDTA 100 mM 37,2g + Tris 10mM 1,2g + Água destilada 890mL).

2.2.2 Eletroforese

Preparar o Tampão (40 ml solução A*; 6,66 ml solução B**; 1.286,6 ml de água destilada) para a eletroforese antes de iniciar a corrida e deixar na geladeira (tampão deve estar a uma temperatura de aproximadamente 4°C).

Retirar as lâminas que estão na Solução de Lise, e colocar em uma cuba. Adicionar a solução do tampão, e aguardar 20 minutos. Ligar a corrente (25V constante) por 20 min, 300 mA. Retirar as lâminas da cuba, lavá-las com o Tampão de Neutralização (48,5g de Tris 0,4M e completar 1000ml com água destilada) 3 vezes, aguardando 5 min entre cada lavagem. Em seguida, lavar com Água Destilada 2 vezes e deixar secar por no mínimo 2h em temperatura ambiente.

*Solução A: NaOH 200g e Água destilada 500 mL

**Solução B: 14,89g de EDTA 200mM e completar com Água Destilada para 200 mL de solução.

2.2.3 Coloração

Fixar por 10 minutos com Solução Fixadora (150g de Ácido Tricloroacético + 50g de Sulfato de Zinco + 50 ml de Glicerol e completar até 1000ml com água destilada), lavar 3 vezes com água destilada e deixar secar em temperatura ambiente por no mínimo 2h. Após este processo, hidratar as lâminas por 5 minutos com Água Destilada.

Preparar a Solução de Coloração (51 ml de Solução A* + 99 ml de Solução B**). Adicionar na cuba e levá-la ao agitador na velocidade mínima por 35 minutos. Lavar 3 vezes com água destilada e colocar em Solução de Parada (0,05 ml de Ácido Acético + 4,96ml de água destilada) por 5 minutos. Lavar novamente 3 vezes com água destilada e deixar secar em temperatura ambiente.

*Solução A: 25 g de Carbonato de Sódio + 500ml de Água Destilada;

**Solução B: 0,5g de Nitrato de Amônio + 0,5g de Nitrato de Prata + 1,25g de Ácido Tungstosalicílico + 2,08 ml de Formaldeído + 500ml de Água Destilada;

2.2.4 Leitura das lâminas

As lâminas serão confeccionadas em duplicata e analisadas 50 células por lâmina. O comprimento dos segmentos deixados nas células após a eletroforese é proporcional à quantidade de dano, classificando-os assim danos de 0 a 4, sendo 0 sem danos e 4, dano máximo.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa SPSS, versão 20.0, utilizando-se o teste de Mann-Whitney para comparações entre os grupos dos índices encontrados e o Teste Correlação de Sperman para relacionar os dados avaliados com outros valores quantitativos, após o Teste de Shapiro-Wilk ter evidenciado uma distribuição não gaussiana. Foi considerado significativo um nível de significância $p \leq 0,05$.

2.4 RECURSOS

Este projeto será realizado com verba de pesquisa já obtida pelo laboratório.

3 RESULTADOS

3.1 PERFIL DA POPULAÇÃO

A tabela 1 apresenta as informações do perfil dos participantes do estudo que foram coletadas a partir de um questionário (anexo 1). Foram divididos em dois grupos: indivíduos agricultores que apresentam exposição a pesticidas (caso) e indivíduos não agricultores e que não estão diretamente expostos (controle).

Tabela 1 – descritiva da população estudada.

	Grupo caso (n: 25)	Grupo controle (n: 25)	p**
Sexo (masculino)	64%	68%	p=1,00
Idade (média ± DP*) (mínimo – máximo)	54,36 ± 10,36 (24 – 72)	50,92 ± 14,02 (25 – 78)	p=0,403
Tempo de trabalho (média ± DP*) (mínimo – máximo)	41,84 ± 11,85 (10 – 62)	—————	—————

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Tabela apresenta comparação entre os indivíduos do grupo caso e controle da amostra. Valores são representados como frequência relativa (%) ou valores mínimo e máximo. *DP: Desvio padrão; p**: o valor de *p* foi calculado mediante os testes estatísticos *qui-quadrado*, *U* de Mann-Withney e teste *t* para amostras independentes;

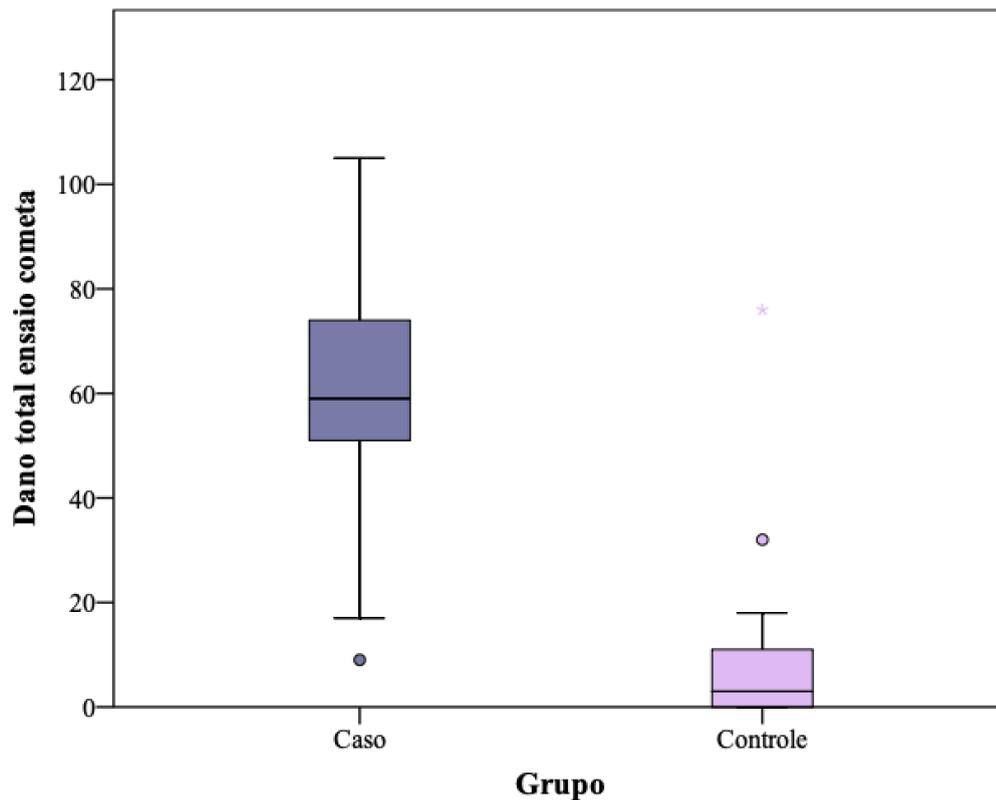
A partir dessa tabela observou-se que 64% dos trabalhadores são do sexo masculino no grupo caso e 68% no grupo controle (p=1,00). A idade média do grupo caso varia entre 24 e 72 anos, tendo uma média de 54,36 (± 10,36). No grupo controle a média é de 50,92 (±14,02) e as idades variam de 25 a 78 anos anos (p=0,403). Foi observado também que o tempo de trabalho médio do grupo caso foi de 41,84 anos variando entre 10 a 62 anos de exposição a pesticidas. O grupo controle por não ter relação com exposição direta a pesticidas, não apresenta dados significativos para tempo de trabalho.

Dessa maneira considera-se que há uma semelhança entre os perfis dos grupos, não apresentando diferenças significativas que possam acometer o estudo (p>0,05).

3.2 ENSAIO COMETA

Os danos de DNA analisados a partir da técnica do cometa têm uma média de 62,36 no grupo caso e de 8,56 no grupo controle (Figura 1), sendo assim a média total de dano no grupo caso foi maior do que o grupo controle ($p < 0,001$).

Figura 1 - comparação de dano entre grupos.



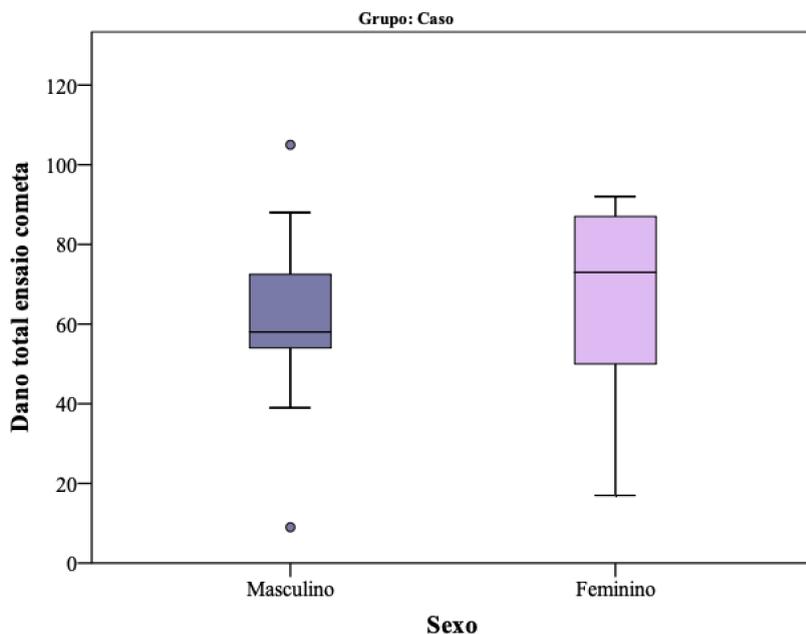
Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Os valores de danos estão expressos em unidades arbitrárias (U.A.). As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; boxes e whiskers representam os interquartis e valores mínimos e máximos respectivamente. °/*: outliers. Teste *t* para variáveis independentes $p < 0,001$.

3.3 COMETA E SEXO

No grupo caso, os danos de DNA analisados a partir da técnica do cometa têm uma média de 60,81 para o sexo masculino e 65,11 para o sexo feminino ($p = 0,598$) (Figura 2). Já no grupo controle a média foi de 6,65 para o sexo masculino e 12,63 para o sexo feminino ($p = 0,002$) (Figura 3).

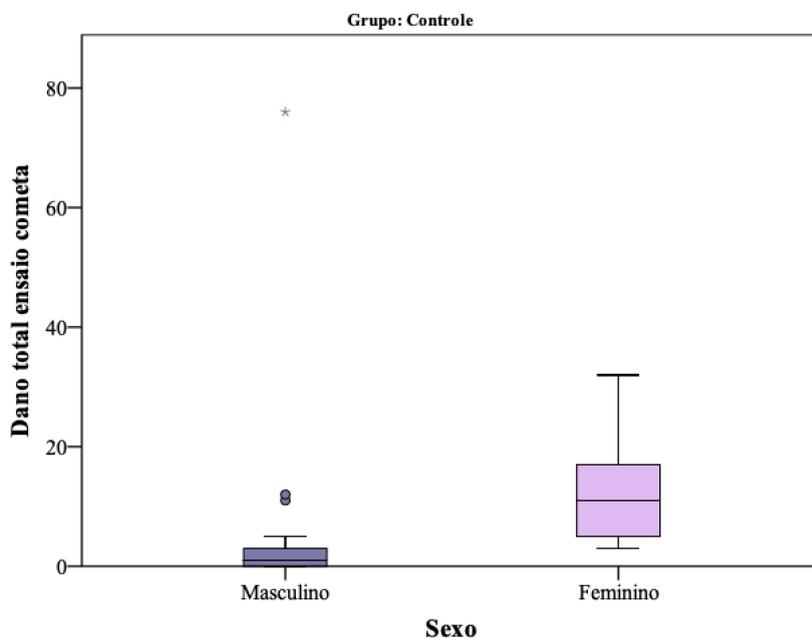
Figura 2 - comparação entre dano e sexo do grupo caso.



Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Os valores da idade estão expressos em unidades arbitrárias (U.A.). As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; boxes e whiskers representam os interquartis e valores mínimos e máximos respectivamente. °: outliers. Teste t para variáveis independentes $p < 0,001$.

Figura 3 - comparação entre dano e sexo do grupo controle.



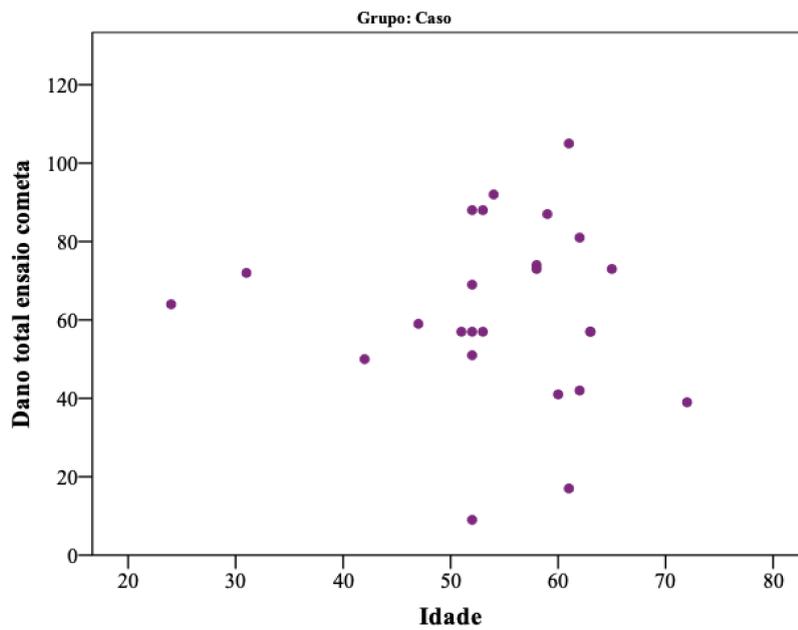
Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Os valores da idade estão expressos em unidades arbitrárias (U.A.). As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; boxes e whiskers representam os interquartis e valores mínimos e máximos respectivamente. °/*: outliers. Teste t para variáveis independentes $p < 0,001$.

3.4 COMETA E IDADE

A correlação de cometa e idade não deu resultados significativos que possam acometer o estudo (caso $p=0,886$; controle $p= 0,163$) (Figuras 4 e 5).

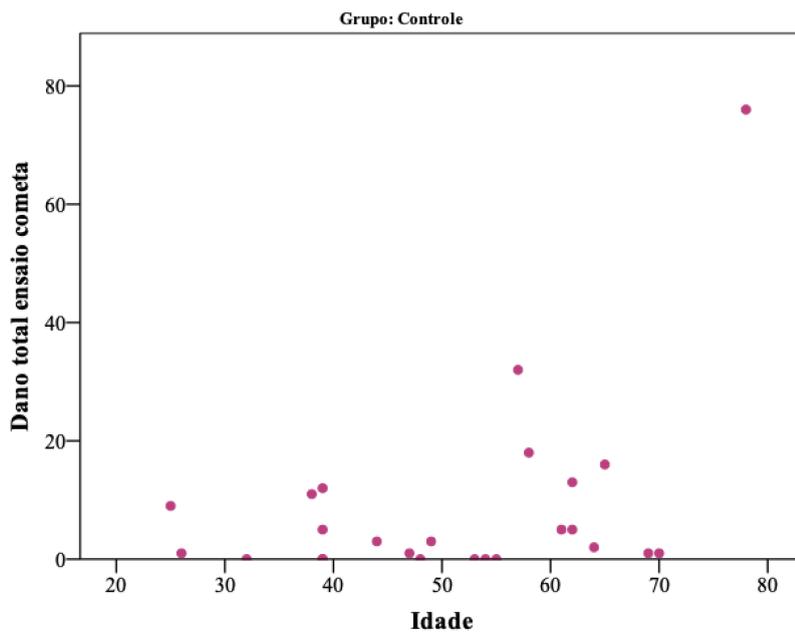
Figura 4 - comparação entre dano e idade do grupo caso.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico de dispersão.

Figura 5 - comparação entre dano e idade do grupo controle



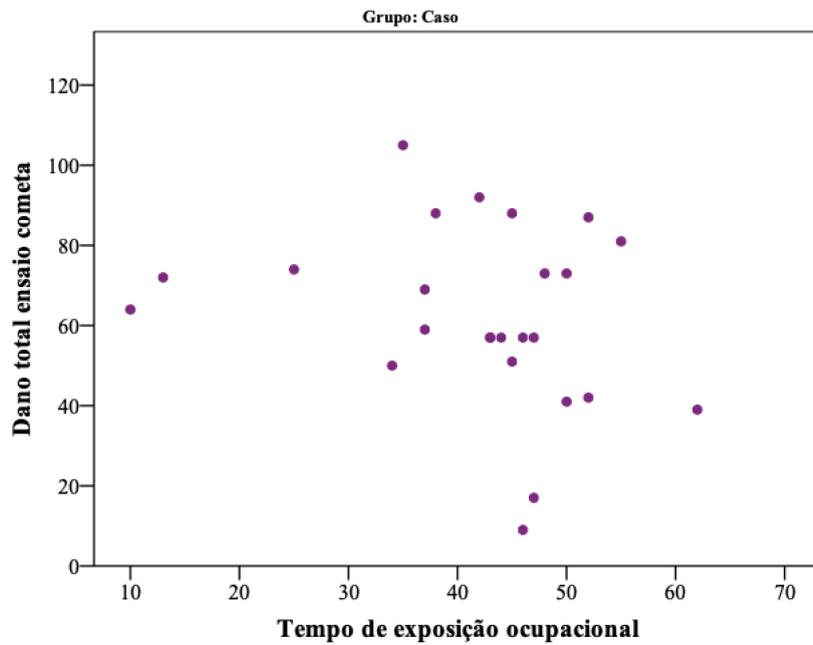
Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico de dispersão.

3.5 COMETA E TEMPO DE TRABALHO

A correlação de cometa e tempo de trabalho não deu resultados significativos ($p=0,162$) (Figura 6).

Figura 6 - comparação entre dano e tempo de trabalho



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico de dispersão.

4. DISCUSSÃO

O uso dos pesticidas no mundo já é considerado um problema ambiental e principalmente de saúde pública e está se intensificando ao passar dos anos. O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de produtos agrícolas no mundo, conseqüentemente faz grande uso de pesticidas a fim de manter a sua produção (PIGNATI, 2017). Em se tratando de números, o país consome em torno de 20% dos pesticidas que são produzidos mundialmente (FERNANDES et al., 2020). Já são evidentes os indícios de problemas na saúde em pessoas que fazem o uso do mesmo e em consumidores de produtos provenientes da agricultura. Trabalhadores rurais e familiares são os mais afetados por haver contato direto com esses produtos (SANTA CATARINA, 2013). Na maioria das vezes o acesso a esses produtos é facilitado havendo uma despreocupação na utilização dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) de maneira adequada, aumentando as chances de intoxicação (SEBRAE/SC, 2013).

A todo momento o DNA é passível de sofrer alterações moleculares por diversos fatores, ao mesmo tempo que o sistema de reparo do sistema imune atua na medida do possível para reverter essas alterações (AZQUETA et al., 2019; SCHUMACHER, et al., 2021). Através do ensaio do cometa é possível avaliar as lesões do tipo fita simples ou duplas, além de sítios de reparos incompletos, danos álcali-lábeis e/ou *crosslinks*, as quais ainda são possíveis de reparo (TICE et al., 2000). Quando a lesão é irreparável a célula morre, acarretando no desenvolvimento de possíveis cânceres (DESAULNIERS et al., 2015).

Neste estudo foram obtidos resultados significativos em relação a quantidade de danos ao DNA entre os grupos controle e caso. O grupo caso apresentou uma média de comprimento de cauda do cometa formada por DNA danificado significativamente maior que o grupo controle ($p < 0,001$). Outros estudos nos quais também foram utilizados o ensaio do cometa como uma forma de quantificar os níveis de danos ao DNA, também obtiveram resultados similares a este. Um estudo ocupacional que avaliou trabalhadores em uma unidade de fabricação de pesticidas na Índia, apontou um aumento nos danos em comparação com o grupo controle (Paramjit, 2003). Outro estudo recente concluiu que efeitos genéticos no DNA em um grupo exposto a pesticidas foi aproximadamente 5 vezes maior do que no grupo controle (Nascimento et al., 2022). Estudos como esses ajudam a corroborar o presente trabalho confirmando a alta exposição aos agrotóxicos e o efeito do mesmo nas células dos trabalhadores rurais analisados.

Apesar de ser esperado que agricultores com idades mais elevadas tivessem mais dano de DNA (PASTOR et al., 2003; MARQUEZ et al., 2005; ALI et al., 2008; FENECH et al.,

2011), não houve correlação significativa entre essas variantes, da mesma maneira quando comparamos o tempo de trabalho e a quantidade de dano. Homens e mulheres também não apresentaram diferença significativa, quanto ao dano de DNA, como descrito em alguns estudos (VIOLANTE et al., 2012; HILGERT et al., 2018). Talvez com uma amostra maior pudéssemos demonstrar a influência desses fatores sobre o dano de DNA.

Os resultados do presente estudo evidenciam fortemente a instabilidade genômica com a exposição ocupacional de pesticidas em agricultores através do ensaio do cometa.

REFERÊNCIAS

- ALI, T. *et al.* Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, June 2008, vol.49(5), 374-380.
- AZQUETA, A. *et al.* DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 781, n. March, p. 71–87, 2019.
- Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, Dos Santos CE, Dias JF, da Silva J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat Res.* 2013 Apr 15;752(1-2):28-33. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.01.001. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23347873.
- BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Gregg. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas , v. 12, n. 2, p. 123-130, Aug. 1999 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52731999000200001&lng=en&nrm=iso>. access on 08 July 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>.
- BOLOGNESI, C. *et al.* Review: Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* (2011), vol. 26 no. 1, 19–26.
- DESAULNIERS, D. *et al.* Causes of genome instability: The effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36, p. S61–S88, 2015.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339, 37–59.
- FAPESC - <http://www.fapesc.sc.gov.br/exposicao-de-trabalhadores-rurais-a-agrotoxicos-esta-sendo-estudada-em-projeto-do-ppsus/>
- FENECH, M. *et al.* The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis* vol. 26 n. 1 (2011), 239-245.
- FERNANDES, C. L. F. *et al.* Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: A critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 22, n. 2, p. 256–270, 2020.
- Genética na Escola.** Canoas, Rs: Sociedade Brasileira de Genética, v. 02, n. 02, 2007. Disponível em: <http://www.medicinabiomolecular.com.br/biblioteca/pdfs/Nutrigenomica/nutrig-0036.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- HILGERT JACOBSEN-PEREIRA, C. *et al.* Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. September 2017, p. 177–183, 2018.

IBAMA. (2017). Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de agrotóxicos no Brasil, Boletim 2017.

Kruszewski M, Iwaneńko T, Machaj EK, et al. Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. *Mutagenesis*. 2012;27(5):551-558. doi:10.1093/mutage/ges018

LOPES, Carla Vanessa Alves and ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde debate* [online]. 2018, vol.42, n.117 [cited 2020-06-18], pp.518-534. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-11042018000200518&lng=en&nrm=iso>. ISSN 2358-2898. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811714>.

MALUF, Sharbel Weidner. **Citogenética Humana**. Florianópolis: Artmed, 2011.

MARQUEZ, C. *et al.* Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (2005), vol.45(1), 1-7.

MATTEI, Lauro. A IMPORTÂNCIA DO SISTEMA FAMILIAR DE PRODUÇÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA. **Revista Necat - Revista do Núcleo de Estudos de Economia Catarinense**, Florianópolis, v. 5, n. 9, p. 3-7, junho de 2016. Semestral. Disponível em: <http://incubadora.periodicos.ufsc.br/index.php/necat/article/view/4170>. Acesso em: 11 set. 2020.

Nadin, Silvina & Vargas-Roig, Laura & Ciocca, Daniel. (2001). A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 49. 1183-6. 10.1177/002215540104900912.

Nascimento, F.d., Silva, .d.M.e., Pedroso, T.M.A. *et al.* Farmers exposed to pesticides have almost five times more DNA damage: a meta-analysis study. *Environ Sci Pollut Res* 29, 805–816 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15573-z>

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde
https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5756:opas-oms-destaca-importancia-da-atuacao-conjunta-dos-setores-da-saude-agricultura-e-meio-ambiente-na-regulamentacao-de-agrotoxicos&Itemid=839

Paramjit Grover, K. Danadevi, M. Mahboob, R. Rozati, B. Saleha Banu, M.F. Rahman, Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay, *Mutagenesis*, Volume 18, Issue 2, March 2003, Pages 201–205, <https://doi.org/10.1093/mutage/18.2.201>

PASTOR, S. *et al.* Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* (2003), vol.18(3), 249-258.

PEREIRA, Carolina Hilgert Jacobsen. **Avaliação da instabilidade genômica e do estresse oxidativo em agricultores expostos a agrotóxicos em um município do estado de Santa Catarina**. 2017. 117 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PIGNATI, Wanderlei Antonio et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciênc. saúde coletiva* [online]. 2017, vol.22, n.10 [cited 2020-08-05], pp.3281-3293. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232017021003281&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1678-4561. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu, Y.F. Sasaki, The single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.

SANTA CATARINA- Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. *Proposta de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos em Santa Catarina*. Florianópolis, 2013.

SEBRAE/SC. Santa Catarina em números: Santo Amaro da Imperatriz/Sebrae/SC. Florianópolis: Sebrae/SC, 2013.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.

Siqueira DF, Moura RM, Carneiro GE, et al. Análise da exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos. *Rev. Bras. Prom. Saúde.* 2013; 26(2):182-191.

VIOLANTE, E.Z. *et al.* Genetic damage and exposure to pesticides among agricultural workers from Valle de San Quintín, Baja California, México. *Revista de Salud Ambiental*, 01 December 2012, vol.12(2), 93-101.

Vivian F. Silva Kahl, Varinderpal Dhillon, Michael Fenech, Melissa Rosa de Souza, Fabiane Nitzke da Silva, Norma Anair Possa Marroni, Emilene Arusievicz Nunes, Giselle Cerchiaro, Tatiana Pedron, Bruno Lemos Batista, Mónica Cappetta, Wilner Martínez-López, Daniel Simon, Juliana da Silva, "Occupational Exposure to Pesticides in Tobacco Fields: The Integrated Evaluation of Nutritional Intake and Susceptibility on Genomic and Epigenetic Instability", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 7017423, 13 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7017423>

ANEXO I - TCLE

Universidade Federal de Santa Catarina
Hospital Universitário – Unidade de Análises Clínicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome: _____

Sexo: () M () F Data de Nascimento:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título da Pesquisa: **Análise de danos ao DNA em leucócitos de agricultores do município de Santo Amaro da Imperatriz - SC que aplicam pesticidas**
2. Pesquisador Principal: Sharbel Weidner Maluf (Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário UFSC)

III – EXPLICAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa, que tem como objetivo avaliar os efeitos ao DNA sobre a saúde de agricultores expostos a pesticidas.

Serão coletadas amostras de sangue (1 tubo de coleta de sangue), para avaliação de seu estado geral de saúde e possíveis efeitos dos agrotóxicos sobre esses exames. A coleta será feita por profissional qualificado, utilizando material descartável, seguindo os procedimentos de assepsia adequados, garantindo assim a sua integridade física. Após a coleta será oferecido alimento aos participantes. Também será aplicado um questionário sobre seus hábitos, seu estado de saúde e seu histórico relacionado ao trabalho, que leva em média 10 minutos para ser respondido.

Todas as análises serão realizadas, de modo a não representar nenhum custo financeiro, para você. Você terá acesso aos resultados e possíveis atendimentos que se fizerem necessários.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Você tem assegurado o direito de a qualquer momento do estudo solicitar informações esclarecedoras sobre o andamento da pesquisa, bem como dos eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo, através dos telefones (48) 37218131/988173072 ou na Unidade de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU) da UFSC (pesquisador), 37219206 ou na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade,

Florianópolis/SC (Comitê de Ética em Pesquisa: grupo de pessoas responsável pela defesa dos interesses dos participantes da pesquisa). E-mail: s.maluf@ufsc.br.

Riscos e desconforto: Pode ocorrer desconforto no momento da coleta. Fica assegurado que no caso de eventual problema na coleta ou qualquer outro dano, como efeitos adversos ou indesejáveis da utilização do produto em investigação ou qualquer outro problema de saúde decorrentes da pesquisa, o Sr(a). receberá assistência imediata integral e tratamento adequado pela equipe de saúde do HU UFSC e será cuidado pelo tempo que for necessário até que sua condição de saúde se restabeleça (não são esperados problemas deste tipo pois os profissionais farão a coleta com o máximo de cautela, no entanto é importante garantir assistência no caso de qualquer problema relacionado ao projeto). O participante terá ajuda no preenchimento do questionário e liberdade de interromper o preenchimento, caso ocorra cansaço para responder ou constrangimento ao responder algumas das questões.

Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 e que o sigilo dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados. Os resultados da pesquisa serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto, e pelo Comitê de Ética. Qualquer prejuízo financeiro ocorrido devido a este estudo ou quebra involuntária de sigilo será ressarcido ou indenizado pelos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.

Os resultados dos exames e avaliações, depois de realizados, serão informados ao Sr.(a) se e quando o Sr.(a) quiser.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação em pesquisa e você não terá nenhuma despesa advinda da sua participação na pesquisa. Caso alguma despesa extraordinária associada à pesquisa venha a ocorrer (com transporte, alimentação e outros), você e seu acompanhante serão integralmente ressarcidos pelos pesquisadores responsáveis pela pesquisa. Caso você tenha algum dano material ou moral em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente.

V – CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Concordo em participar do presente Protocolo de Pesquisa bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento (o participante pode retirar seu consentimento a qualquer momento). Pelo presente consentimento, declaro que fui

esclarecido sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma via deste termo, elaborado em duas vias, assinadas pelos pesquisadores.

Data:

Assinatura do participante

Pesquisador Principal

Obs. Todas as páginas deste documento deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável e pelo participante da pesquisa.

ANEXO II - Questionário

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS

1. Questionário número: ___
 Data: __/__/__
 Localidade:
DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE I
1. Nome do entrevistado:
 Data de nascimento: __/__/__
 Idade: ___ anos completos
 Local de nascimento: cidade _____ estado ___
EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (Assinale quando SIM)
1. O que você Planta? _____
1. Quanto você produz anualmente? _____
1. Qual o período da(s) Safra(s)? _____
1. Quando você faz a aplicação de agrotóxicos durante a safra? _____
1. Quantas horas duram as aplicações? _____
1. Em qual turno você normalmente aplica? () matutino () vespertino
1. Quais agrotóxicos você utiliza atualmente?

1. Você se lembra qual agrotóxicos você mais usava a 20 anos atrás? _____
1. Como você compra os agrotóxicos? () Com receita () Sem receita
1. Você lê as bulas antes de utilizar o produto? () Sim () Não
1. Quantas vezes por semana você utiliza () Uma () Pelo menos duas () 3 ou mais
1. O que você faz com o agrotóxico? () Prepara a calda () aplica o produto
1. Como você faz a aplicação? () Pulverizador costal () Máquina
1. Quando foi a sua última exposição? _____ horas ou _____ dias
1. Qual(is) foi(RAM) o agrotóxico(s) utilizado(s)?

1. Você utiliza algum EPI? () Sim () Não
1. Qual EPI você utiliza? () Máscaras () Luvas () Botas () Roupas de manga comprida

1. Após o manuseio do agrotóxico você: () continua normalmente suas Atividades () Lava as mãos antes de continuar suas atividades () Toma banho antes de continuar suas atividades

1. Ao aplicar os agrotóxicos molha a roupa: () Todos os dias () Às vezes

HISTÓRIA OCUPACIONAL (escrever no verso se necessário)

27. Quantos anos você tinha quando começou a trabalhar? ___ anos

28. Que trabalhos executou desde então? Por quanto tempo?

FUNÇÃO/ATIVIDADE EMPRESA OU LOCALIDADE, MUNICÍPIO PERÍODO

a. _____

b. _____

c. _____

d. _____

Conferir se o tempo de trabalho referido nas perguntas acima corresponde ao tempo de trabalho de toda história Ocupacional. Se não, completar.

HISTÓRIA CLÍNICA

28. Quantas intoxicações por agrotóxicos você já teve ao longo da vida? _____

30. Queixa atual:

31. História Progressiva da moléstia atual:

(início, duração, característica do sintoma no início, evolução, relação com outras queixas, situação atual).

1. Você tem filhos? () sim () não

33. Você teve alguma complicação na gravidez? () sim () não

Qual? _____

34. Já teve algum aborto espontâneo? () sim () não

Quantos?

EXAME FÍSICO

35. Estado Geral: () bom () regular () ruim

36. Peso:

37. Altura:

38. Frequência Respiratória:

39. Pressão Arterial:

40. Pulso:

INTERROGATÓRIO SOBRE DIFERENTES PATOLOGIAS

DIABETES

1. Você tem diabetes () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem diabetes () sim () Não

50. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

HIPOTIREODISMO

1. Você tem hipotireoidismo () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem hipotireodismo () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

AUDIÇÃO

1. Você tem algum problema de audição? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você apresenta alguma dificuldade para entender a fala quando há várias pessoas falando ao mesmo tempo, ou quando há ruído competitivo?

() sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem zumbido? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem tontura? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. As pessoas da sua família reclamam que você não escuta bem?

() sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem ou teve exposto ao ruído?

() sim () Não Por quanto tempo? _____ anos

Há quanto tempo? _____ anos

EPILEPSIA

1. Você tem ou teve crises (ataques, acesso, convulsão) na qual perde a consciência e cai subitamente? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem ou teve crises em que perde o contato com a realidade (meio) e fica como se estivesse fora do ar? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem ou teve crises na qual tem repuxões incontroláveis em braços, pernas, na boca ou vira a cabeça para o lado?

() sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem ou teve crises de desmaio e que ao acordar nota que fez xixi ou cocô na roupa sem perceber? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem ou teve crises na qual sente sensação ruim de “fundeza” ou bola na “boca do estômago” e que sobe até a garganta e em seguida sai fora do ar, e depois dizem que você ficou mexendo em algo com as mãos ou mastigando ou olhando para algo distante? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Algum médico ou profissional de saúde ou mesmo familiares já lhe disse que você tem ou teve convulsão febril na infância; ou durante alguma doença grave qualquer? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Você tem rápidos abalos tipo “choque” nos braços (as coisas caem da mão) ou pernas com ou sem queda, principalmente pela manhã?

() sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

1. Há alguém desta casa com epilepsia?

() sim () Não Há quanto tempo? _____ anos

1. Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

1. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

DEPRESSÃO E ANSIEDADE

Marque com um 'X' a resposta que melhor corresponder com o que o paciente refere sentir na ÚLTIMA SEMANA. Não é preciso ficar pensando muito em cada questão. Neste questionário as respostas espontâneas têm mais valor *do* que aquelas em que se pensa muito.

Marque apenas uma resposta para cada pergunta.

1. **Quando você se sente tenso ou contraído**

3 () A maior parte do tempo

2 () Boa parte do tempo

1 () De vez em quando

0 () Nunca

1. **Você sente gosto pelas mesmas coisas de antes?**

0 () Sim, do mesmo jeito que antes

1 () Não tanto quanto antes

2 () Só um pouco

3 () Já não sinto mais prazer em nada

1. **Você sente uma espécie de medo, como se alguma coisa ruim pudesse acontecer?**

- 3 () Sim, e de um Jeito muito forte
- 2 () Sim, mas não tão forte
- 1 () Um pouco. mas isso não me preocupa
- 0 () Não sinto nada disso

1. **Você da risada e se diverte quando vê coisas engraçadas?**

- 0 () Do mesmo jeito que antes
- 1 () Atualmente um pouco menos
- 2 () Atualmente bem menos
- 3 () Não consigo mais

1. **Você está com a cabeça cheia de preocupações?**

- 3() A maior parte de tempo
- 2() Boa parte do tempo
- 1() De vez em quando
- 0() Raramente

1. **Você se sente alegre?**

- 3 () Nunca
- 2 () Poucas vezes
- 1 () Muitas vezes
- 0 () A maior parte do tempo

1. **Você consegue ficar sentado à vontade e se sentir relaxado?**

- 0 () Sim, quase sempre
- 1 () Muitas vezes
- 2 () Poucas vezes
- 3 () Nunca

1. **Você sente que está lento para pensar e fazer as coisas?**

- 3 () Quase sempre
- 2 () Muitas vezes
- 1 () De vez em quando
- 0 () Nunca

1. **Você tem uma sensação ruim de medo, como um frio na barriga ou um aperto no estômago?**

0 () Nunca

1 () De vez em quando

2 () Muitas vezes

3 () Quase sempre

1. **Você perdeu o interesse em cuidar da sua aparência?**

3 () Completamente

2 () Não estou mais me cuidando como deveria

1 () Talvez não tanto quanto antes

0 () Me cuido do mesmo [eito que antes

1. **Você se sente inquieto, como se não pudesse ficar parado em lugar nenhum?**

3 () Sim, demais

2 () Bastante

1 () Um pouco

0 () Não me sinto assim

1. **Você fica esperando animado as coisas boas que estão por vir?**

0 () Do mesmo jeito que antes

1 () Um pouco menos do que antes

2 () Bem menos do que antes

3 () Quase nunca

1. **De repente, você tem a sensação de entrar em pânico?**

3 () A quase todo momento

2 () Várias vezes

1 () De vez em quando

0 () Não sinto isso

1. **Você consegue sentir prazer quando assiste a um bom programa de televisão, de rádio ou quando lê alguma coisa?**

0 () Quase sempre

1 () Várias vezes

2 () Poucas vezes

3 () Quase nunca

CONSUMO DE TABACO

109. Você já fumou?: ()sim, ainda fuma ()não/nunca () sim, mas parou há __anos

110. Há quantos anos você fuma ou durante quantos anos você fumou?

Há __ anos OU há __ meses OU durante __ anos
111. O que você fuma ou fumou MAIS? () cigarro comercial () cigarro de palha () charuto () cachimbo () outro: _____
112. Quantos CIGARROS em média você fuma ou fumava por dia ou por semana? cigarros/dia OU cigarros/semana
113. Se já parou de fumar, por que você parou? _____
CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA
114. Qual bebida você mais gosta de beber? _____
115. Com que idade você começou a beber? ____ anos
116. Qual bebida você costuma(va) beber mais frequentemente? () cerveja () cachaça () outra: _____
117. Quantas doses você costuma(va) beber por semana? Um drinque ou uma dose é: uma cerveja longneck ou latinha; meia cerveja grande (600 ml) ou chopp (350 mL); uma dose de pinga, uísque ou outro destilado (50ml) ou uma taça de vinho (150ml). Cerveja ou chopp: ____ Cachaça ou uísque ____ Vinho: ____ Anotar frequência por mês, se for necessário: _____
118. Se parou de beber, por que você parou? _____
CONSUMO DE ALIMENTOS E ÁGUA
119. Você se alimenta de: () Carnes e verduras () Não come carne () Mais de uma porção de carne vermelha todos os dias
120. Qual a sua fonte de alimentos (carnes e verduras) () Produção própria () compra dos vizinhos () supermercado
121. Qual a sua fonte de água? () Córrego próximo a casa () Fonte de água natural () Água encanada () Poço artesiano
122. Onde são descartados os resíduos de seu banheiro? () Há saneamento básico () Diretamente no córrego
123. Você toma chimarrão? () Todos os dias () Algumas vezes por semana
MEDICAMENTOS
124. Você costuma tomar algum remédio por conta própria? () Sim () Não
125. Quais? _____ _____
126. Com que frequência? () Diariamente () Semanalmente () De vez em quando
127. Você toma algum medicamento prescrito pelo seu médico? () Sim () Não
128. Quais? _____ _____
129. Com que frequência? () Diariamente () Semanalmente () De vez em quando

DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE II

130. Cor: () Branca () Negra () Pardo () Outra: _____

131. Estado civil atual: () solteiro () casado () com companheira () viúvo () separado/divorciado/desquitado

132. Até que ano (série) você estudou na escola? Completei o (a) _____ ano (série) do _____ na escola.

133. Qual sua religião? () sem religião () Católica () protestante/crente/evangélico () espírita () outra _____

134. Quais e quantos deste itens você possui em sua casa?

		Tem			
	Não tem	1	2	3	4
Televisão em cores					
Vídeo cassete ou DVD					
Rádio					
Banheiro					
Automóvel					
Máquina de lavar					
Geladeira					
Freezer (independente ou parte da geladeira duplex)					
Trator					