Recebido em: 08/06/2019
Aceito em: 28/09/2019

REVISTA DE ARQUEOLOGIA

Volume 32 No. 2 2019 Edição Especial: Museu Nacional (Volume 1)

ARTIGO

MICROARQUEOBOTÂNICA NO MUSEU NACIONAL, UFRJ: ESTADO DA ARTE DE UMA DISCIPLINA INOVADORA E PRIMEIROS RESULTADOS DE ESTUDOS RECENTES

Célia Boyadjian*, Rita Scheel-Ybert, Anelise Barros***, Rodrigo Oliveira****, Maria Jacqueline Rodet*****, André Prous******

RESUMO

Os primeiros estudos microarqueobotânicos, ainda que não fossem conhecidos por esse nome, remontam ao início do século XX. No entanto, a análise de fitólitos e grãos de amido recuperados de contextos arqueológicos no Brasil só começou a tomar forma há pouco mais de uma década, e ainda são poucos os grupos de pesquisa que estudam esses microvestígios no país. O Museu Nacional/UFRJ congrega um dos grupos pioneiros na área. Neste artigo é apresentado um breve histórico da disciplina no país e um pouco da trajetória dessa linha de pesquisa no Museu Nacional, incluindo os resultados preliminares de dois projetos recentes.

Palavras-chave: Microbotânica; Grãos de Amido; Fitólitos.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós-Graduação em Arqueologia. E-mails: boyadjian.celia@mn.ufrj.br ou boyadjian.celia@gmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5679-5963 .
** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós-Graduação em Arqueologia. E-mail: scheelybert@mn.ufrj.br. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9428-9348.
*** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós-Graduação em Arqueologia. a.nelise_martins@hotmail.com. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8889-3592.
**** Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. E-mail: eliaso@usp.br ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3770-7774 .
***** Universidade Federal de Minas Gerais, Museu de História Natural, setor de arqueologia. E-mail: mjrodet.ufmg@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5742-5999 .
****** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas, Departamento de Sociologia e Antropologia. E-mail: aprous80@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7548-4498.

DOI: https://doi.org/10.24885/sab.v32i2.717

ARTICLE

MICROARCHAEOBOTANY AT THE *MUSEU NACIONAL*: THE STATE OF THE ART OF AN INNOVATIVE LINE OF RESEARCH AND FIRST RESULTS OF TWO RECENT STUDIES

ABSTRACT
The first microarchaeobotanical studies, although not known by this name at the time, date back to the beginning of the 20th century. However, the analysis of phytoliths and starch grains recovered from Brazilian archaeological contexts only started to flourish a little over a decade ago. There are still few groups that study these micro-remains in the country. One of the pioneers is part of the *Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro*. In this paper we present a brief historical background of the field in Brazil and the trajectory of this line of research at the *Museu Nacional*, including the preliminary results of two recent projects.

Keywords: Microbotany; Starch Grains; Phytoliths.

ARTÍCULO

MICROARQUEOBOTÁNICA EN EL *MUSEU NACIONAL*: ESTADO DEL ARTE DE UNA LINEA DE INVESTIGACIÓN INNOVADORA Y PRIMEROS RESULTADOS DE DOS ESTUDIOS RECIENTES

RESUMEN
Los primeros estudios microarqueobotánicos, aunque no fueron conocidos por ese nombre, se remontan a principios del siglo XX. Si bien, el análisis de fitolitos y granos de almidón recuperados de contextos arqueológicos brasileños comenzó a tomar forma hace poco más de una década, aún hoy son pocos los grupos de investigación que estudian estos microvestigios en el país. El *Museo Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, congrega a uno de los grupos pioneros en el área. En este artículo se realizará un breve relato de la historia de la disciplina en el país y de la trayectoria de esta línea de investigación desarrollada en el *Museo Nacional*. Se incluyen resultados preliminares de dos recientes proyectos de investigación.

Palabras clave: Microbotánica; Gránulos de Almidón; Fitolitos.

INTRODUÇÃO

O termo "microvestígios botânicos/vegetais" se refere a partículas microscópicas provenientes de plantas que apresentam alto potencial de conservação e são excelentes indicadores ambientais e ecológicos. Eles constituem registros de grande importância para muitas disciplinas científicas. Na arqueologia, são essenciais para investigações sobre uso, consumo, cultivo e domesticação de plantas, especialmente em ambientes que não favorecem a preservação de vestígios botânicos macroscópicos, como regiões tropicais (SANDWEISS, 2007).

Os principais tipos de microvestígios botânicos recuperados de contextos arqueológicos são: fitólitos, grãos de amido e grãos de pólen (para detalhes sobre cada partícula, veja: FAEGRI & IVERSEN, 1989; PIPERNO, 2006; TORRENCE & BARTON, 2006; PEARSALL, 2015).

Os grãos de pólen, especificamente, são objeto de estudo da palinologia[1], disciplina bem estabelecida no Brasil e internacionalmente (SALGADO-LABOURIAU, 1973; FAEGRI & IVERSEN, 1989). Entre suas diversas subdisciplinas (palinotaxonomia, paleopalinologia, palinologia forense, etc.), encontra-se a arqueopalinologia (FAEGRI & IVERSEN, 1989). Os primeiros estudos de pólen aplicados à arqueologia ocorreram na Europa no início do século passado (BRYANT & HOLLOWAY, 1983:192). A partir de 1960-70, a arqueopalinologia foi bem difundida, inclusive com pesquisas na América do Sul (PEARSALL, 2015: 192) e no Brasil (*e. g.*: CHAVES, 2001, 2002; CHAVES & REINHARD, 2006; FREITAS *et al.*, 2015). Além disso, trabalhos de paleopalinologia frequentemente fazem inferências sobre atividade humana e interferência humana no ambiente, o que é comum inclusive no Brasil (*e. g.*: BEHLING, 1996; IRIARTE & BEHLING, 2007; BISSA *et al.*, 2009; VAL-PEÓN *et al.*, 2017).

Os fitólitos e grãos de amido, por sua vez, apesar de conhecidos e estudados desde o século XIX, e mesmo tendo o potencial para interpretações ambientais e arqueológicas reconhecido já no início do século XX, só passaram a figurar na arqueologia a partir dos anos 1970-80. Nos últimos 20 anos, as pesquisas com esses vestígios avançaram de modo significativo e se difundiram mundialmente (PIPERNO, 2006; TORRENCE & BARTON, 2006; PEARSALL, 2015; HART, 2016).

Os estudos de fitólitos e de amido vêm se estabelecendo como duas linhas de pesquisas relativamente independentes. No entanto, é comum a integração das análises de ambas as partículas em investigações arqueobotânicas. Assim, o termo "micropaleoetnobotânica" surgiu em 2014 como título de um encontro[2] realizado no Uruguai que reuniu especialistas do continente americano nas análises de fitólitos e de grãos de amido de diferentes áreas (*Micro paleoetnobotánica: relevancia de uma red interdisciplinaria de investigaciones em fitolitos y almidones* - DEL PUERTO *et al.*, 2014). O intuito da oficina era integrar os grupos de pesquisa de diferentes países do continente, reunindo esforços para desenvolver bancos de dados conjuntos e se debruçar sobre questões teóricas e metodológicas ainda em aberto nas duas linhas de pesquisa. Pouco depois, Scheel-Ybert propôs a adoção do termo "microarqueobotânica", argumentando

---

[1] Além dos grãos de pólen, a palinologia também estuda outros "palinomorfos" (partículas biogênicas que se preservam após tratamento químico para a separação do pólen), como esporos de samambaias, musgos e fungos, algas, dinoflagelados etc. (HALBRITTER *et al.*, 2018)

[2] Nesse encontro foram discutidas questões pertinentes ao desenvolvimento e fortalecimento da disciplina na América Latina, como: métodos de amostragem, extração, análise e conservação de fitólitos e grãos de amidos (provenientes de material arqueológico, sedimentar e de plantas atuais); métodos de sistematização e classificação dos microvestígios; aspectos políticos e metodológicos para criar, expandir e compartilhar coleções de referência regionais. Os resumos expandidos dos trabalhos apresentados encontram-se em DEL PUERTO *et al.*, 2014.

que este último "carrega a dupla vantagem de ser mais curto e de enfatizar a filiação arqueológica da disciplina" (SCHEEL-YBERT, 2016:120-121).

As pesquisas no campo da microarqueobotânica foram inicialmente focadas em reconstituição de paleoambiente e na investigação do potencial dos fitólitos e dos grãos de amido, para a identificação de culturas alimentares (*food crops*) importantes (e.g.: ROVNER, 1971; PEARSALL, 1978; PIPERNO, 1983, 1984; PIPERNO & HOLST, 1998). Nas últimas décadas, elas se tornaram fundamentais na busca pelas origens e intensificação da agricultura e vêm demostrando que o cultivo e a domesticação de vegetais começaram muito mais cedo do que se imaginava em diversas regiões, inclusive na América Tropical (*e.g.*: IRIARTE *et al*., 2004; PERRY *et al*., 2006; DICKAU *et al*., 2007; PIPERNO, 2011; IRIARTE & DICKAU, 2012). Nos últimos anos, os estudos se diversificaram e hoje abrangem temas como: dieta, subsistência e produção de alimento (*e. g.*: BALL *et al*., 2016); o papel das plantas nas sociedades pré-agrárias (HARDY & KUBIAK-MARTENS, 2015); uso medicinal e ritualístico de plantas (*e. g.*: POWER *et al*., 2014); uso do solo e áreas de atividade (*e. g.*: SHILITO & RYAN, 2013); uso de artefatos para processamento, preparo e armazenamento de plantas (*e. g.*: PERRY, 2004); e, até mesmo, a interação entre humanos e outros animais (WEBER & PRICE, 2015).

O progresso da disciplina também vem acompanhado de um esforço orientado para o desenvolvimento, refinamento e aplicação de técnicas que permitam a recuperação e análise de múltiplas categorias de microvestígios a partir de uma mesma amostra (COIL *et al.*, 2003). Isso inclui tanto os grãos de amido e fitólitos quanto outras partículas botânicas como grãos de pólen, esporos e vestígios com menor poder taxonômico, mas que podem ter algum potencial informativo para os contextos estudados. Alguns protocolos permitem a recuperação, inclusive, de partículas biogênicas não botânicas, como esporos de fungos, frústulas de diatomáceas, espículas de esponja e escamas ou fragmentos de tecido muscular de peixe (*e. g.*: BOYADJIAN *et al.*, 2007; BOYADJIAN, 2012; DUDGEON & TROMP, 2012; CRISTIANI *et al*., 2018), que, para além do uso de plantas, fornecem informações importantes a respeito de outros aspectos da vida dos grupos estudados. Tal estratégia permite superar as limitações inerentes a cada categoria de microvestígio (COIL *et al*., 2003), ampliando a gama de informações obtidas e deixando a microarqueobotânica em posição de oferecer interpretações arqueológicas e paleoambientais mais robustas.

FITÓLITOS E GRÃOS DE AMIDO

Os fitólitos são biomineralizações[3] produzidas pelas plantas (no interior das ou entre as células) que, em diversos *taxa*, apresentam formas e tamanhos característicos, o que favorece sua identificação (PIPERNO, 1988; MULHOLLAND & RAPP, 1992; PEARSALL, 2015). Costumam ser observados em folhas, caules, sementes e flores/inflorescências, mas podem se formar em outros órgãos (PIPERNO, 1988; PEARSALL, 2015). Estão envolvidos na sustentação, proteção contra herbivoria e em funções fisiológicas das plantas e são encontrados em um grande número de famílias botânicas, embora a produção varie entre os diferentes grupos taxonômicos (OKUDA & TAKAHASHI, 1964; SANGSTER, 1985; MULHOLLAND & RAPP, 1992).

[3] O termo fitólito pode ser usado para designar tanto partículas de sílica (silicofitólitos) quanto compostos cálcicos, como oxalato ou carbonato de cálcio (calcifitólitos) (PIPERNO, 1988:11). Contudo, alguns pesquisadores consideram que as partículas de cálcio não são tão diagnósticas quanto as partículas de sílica (PIPERNO, 1988: 11) e acreditam que elas não se preservem bem em sedimento, ou que sejam difíceis de serem extraídas desse tipo de amostra (PEARSALL, 2015:254). Por isso, preferem restringir o termo fitólitos às partículas de sílica (PIPERNO, 1988; PEARSALL, 2015).

Ainda que os fitólitos possam sofrer erosão e dissolução[4], eles são muito resistentes ao decaimento. Assim, podem ser encontrados em contextos em que a preservação de vestígios orgânicos (macrovestígios botânicos e pólen, por exemplo) é prejudicada (PIPERNO, 1988; PEARSALL, 2015). São, desse modo, ótimos indicadores paleoambientais, já que permitem estabelecer sequências de longa duração.

Todas essas características (resistência à decomposição; produção em muitas famílias botânicas e alta produção em certos grupos; e a existência de tipos morfológicos variados e diagnósticos que possibilitam a identificação das plantas que os originaram), fazem dos fitólitos vestígios muito interessantes para a arqueologia (ROVNER, 1971; PEARSALL, 2015). Sua análise possibilita identificar plantas selvagens e domesticadas, fornecendo dados sobre dieta, subsistência e produção de alimentos; fazer inferências sobre a função de artefatos; obter informações sobre o ambiente passado e investigar as interações humanos-ambiente; ter insights sobre áreas de atividade, rituais e práticas de sepultamento; entre outros (PEARSALL, 2015: 253).

Os grãos de amido são compostos de polímeros de carboidrato e são a principal forma de armazenamento de energia das plantas (GOTT *et al.*, 2006; LEHNINGER, *et al.*, 1993). São orgânicos, portanto relativamente frágeis (BARTON & MATTHEWS, 2006; HENRY *et al.*, 2009), o que prejudicaria, *a priori*, sua recuperação e identificação em amostras arqueológicas. Porém, diversas pesquisas demonstram que podem perdurar por milhares de anos, sendo encontrados em contextos e ambientes diversos, até mesmo em sítios a céu aberto em região tropical (BARTON & MATTHEWS, 2006; TORRENCE, 2006).

Grãos de amido são encontrados em abundância em órgãos de reserva, como tubérculos, raízes tuberosas, rizomas, certos frutos e sementes, que, por isso, são ótimas fontes de energia para humanos e animais. O grande potencial da análise de amido na arqueologia decorre, portanto, do fato das plantas amiláceas estarem intimamente ligadas à alimentação humana (HASLAM, 2004; TORRENCE, 2006). Assim, esse tipo de partícula tem fundamental importância em investigações a respeito de: exploração de recursos vegetais ligada a estratégias de forrageamento; mudanças nas estratégias de subsistência de um determinado grupo ao longo do tempo; origem e dispersão do cultivo; processos de domesticação e difusão de plantas domesticadas; entre outros.

Os grãos de amido são essenciais para investigar o consumo de órgãos subterrâneos de reserva em regiões tropicais e a domesticação das plantas que os produzem (PIPERNO & HOLST, 1998; TORRENCE & BARTON, 2006; SANDWEISS, 2007). Como esses órgãos costumam ser consumidos inteiros, são frágeis e não se conservam bem por carbonização, seus vestígios macroscópicos normalmente são raros nos sítios arqueológicos (PIPERNO & HOLST, 1998; PEARSALL, 2015). Além disso, as plantas produtoras de órgãos subterrâneos de reserva geralmente produzem poucos grãos de pólen e poucos fitólitos (ou produzem fitólitos não identificáveis), mas contêm amido de reserva abundante e diagnóstico. Desse modo, o amido tem sido a chave para compreender, no exemplo da América do Sul, a história de plantas economicamente importantes, como mandioca, inhame, araruta e outras (*e.g.* PIPERNO & HOLST, 1998; PIPERNO *et al.*, 2000).

Quando as plantas se deterioram, são processadas ou mastigadas, seus tecidos que contém as micropartículas são degradados ou destruídos, liberando-as. Então, essas partículas são incorporadas ao solo/sedimento, podem ficar aderidas à superfície ou retidas em fendas e depressões de artefatos diversos (como vasilhas cerâmicas utilizadas

[4] A solubilidade dos corpos de sílica aumenta em meio mais alcalino, mas há diferença na velocidade de solubilização em diferentes grupos taxonômicos (PIPERNO, 1988: 46-47)

para armazenar ou cozinhar alimento ou mós utilizadas para triturar grãos), ou, até mesmo, ficar aprisionadas em cálculo dentário (tártaro). Os microvestígios botânicos podem ser encontrados nos mais diversos tipos de materiais arqueológicos (exemplos em: TORRENCE & BARTON, 2006; PEARSALL, 2015).

Através de protocolos de laboratório específicos para cada tipo de amostra arqueológica, as micropartículas são recuperadas e depois analisadas sob microscópio óptico[5]. Características como forma, tamanho, detalhes da superfície e da estrutura interna (nesse último caso, apenas para amido) são observadas para a descrição e classificação de acordo com códigos internacionais (*e. g.*: MADELLA *et al.*, 2005; ICSN, 2011). Os microvestígios são então comparados com análogos provenientes de amostras de referência atuais ou arqueológicas e, quando possível, determina-se a planta de origem. Dependendo das características do microvestígio e da abrangência da coleção de referência, é possível até mesmo chegar ao gênero ou à espécie. Descrições e imagens de microvestígios disponíveis na literatura especializada também são consultadas para a identificação.

Embora não restem dúvidas quanto à grande potencialidade dos estudos dos microvestígios como ferramenta em investigações diversas, essa é uma disciplina em franco desenvolvimento e, por isso, ainda há questões teóricas e metodológicas em aberto (PEARSALL, 2015; HASLAM, 2004; PIPERNO, 2006; TORRENCE & BARTON, 2006; BOYADJIAN *et al.*, 2007; ERRA, 2010; ICSN, 2011; CROWTHER *et al.*, 2014). Algumas dessas questões vêm sendo estudadas no Museu Nacional, instituição que tem contribuído significativamente para o avanço da área no Brasil.

PRIMEIROS ESTUDOS MICROARQUEOBOTÂNICOS NO BRASIL

Na América do Sul, muitos dos estudos seminais foram desenvolvidos por pesquisadores estrangeiros, como, por exemplo, Pearsall (1978), que investigou o cultivo de milho através de fitólitos encontrados em amostras de sedimento do sítio Real Alto, Equador; ou Ugent e colaboradores, que, através da análise de grãos de amido, identificaram restos macroscópicos de tubérculos e raízes, como batata e batata-doce, encontrados em sítios arqueológicos no Vale de Casma, Peru (UGENT *et al.*, 1981; 1982).

Atualmente, há grupos locais de pesquisa bem estabelecidos e com reconhecida importância em microarqueobotânica, em especial na Argentina, Colômbia, Chile e Uruguai (*e. g.*: KORSTANJE & BABOT, 2007; MUSAUBACH *et al.*, 2013; DEL PUERTO & INDA, 2003; PLANELLA *et al.*, 2012). No Brasil, essas pesquisas ainda são incipientes, mas há esforços pontuais e equipes dedicadas ao estabelecimento da área, a exemplo do Museu Nacional, como demonstrado mais adiante.

As primeiras pesquisas com fitólitos no país não foram aplicadas à arqueologia. Elas foram realizadas nos anos 1960, principalmente por Labouriau e equipe (SENDULSKY & LABOURIAU, 1966; CAMPOS & LABOURIAU, 1969; SILVA & LABOURIAU, 1970; SÖNDAHL & LABOURIAU, 1970; FIGUEIREDO & HANDRO, 1971), embora, na mesma época, Cavalcante (1968) também tenha realizado importante contribuição com seu trabalho sobre gramíneas da Amazônia, referência ainda hoje.

A série de trabalhos de Labouriau consiste no estudo da formação e morfologia de fitólitos de espécies de gramíneas, buscando verificar sua aplicação taxonômica e produzir informações para distinguir o cerrado de formações florestais vizinhas a partir

[5] O microscópio óptico de luz transmitida com filtro de polarização é o instrumento de rotina utilizado nas análises microarqueobotânicas. No entanto, análises complementares ou especiais podem ser realizadas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV). Outras técnicas, como o uso de corantes ou enzimas digestivas, também podem ser aplicadas, embora não sejam aconselháveis para microvestígios arqueológicos, pois podem dificultar ou até mesmo impedir análises posteriores.

de fitólitos de solo. Tais pesquisas contribuíram com o aprimoramento de métodos de extração e identificação de fitólitos (LUZ *et al.*, 2015) e, mesmo sendo fundamentalmente botânicas, propunham uma nova abordagem para estudos no Brasil (LABOURIAU, 1983). Pioneiras, tais pesquisas envolveram instituições de Brasília, São Paulo e Rio de Janeiro, incluindo o Museu Nacional. O próprio Labouriau foi estagiário do Museu no início de sua carreira (HANDRO, 1995)

Após uma lacuna de mais de duas décadas, as pesquisas com fitólitos foram retomadas em trabalhos pontuais que os utilizaram como marcadores para reconstituições paleoambientais (PIPERNO & BECKER, 1996; ALEXANDRE *et al.*, 1999). Tais pesquisas começaram a se expandir a partir de meados dos 2000, voltando-se principalmente aos campos da botânica – com trabalhos focados na preparação de coleções de referência – e ciências do solo (*e.g.*: CALEGARI, 2008; COE, 2009; COSTA *et al.*, 2011; RASBOLD *et al.*, 2011), mas também se inserindo, ainda que timidamente, na arqueologia.

O amido, amplamente estudado nas ciências dos alimentos, velho conhecido da botânica e da química, e anteriormente restrito a tais áreas, fez sua aparição na arqueologia brasileira também nessa época, através das pesquisas de Freitas (2002, 2004). Interessado na investigação das origens e dispersão do cultivo e domesticação na América do Sul, ele estudou macrovestígios de mandioca e milho do Vale do Peruaçu (MG), datados entre 1010 e 570 anos AP. Grãos de amido bem preservados nesses macrovestígios permitiram ao pesquisador confirmar a identificação do fragmento da raiz de mandioca e verificar que havia uma maior variabilidade nas amostras de milho arqueológico, ao compará-las com um conjunto de raças de milho atuais (FREITAS, 2002, 2004). Os dados também indicaram que parte do conjunto genético de raças de milho conhecidas atualmente já eram cultivadas há pelo menos 1000 anos. Freitas (2004) inferiu, ainda, que como os dados mostram uma maior relação das amostras de milho arqueológicas com milho de terras baixas, os grupos pré-históricos da região estudada teriam tido maior influência de grupos da América Central e Norte da América do Sul do que dos Andes.

Os estudos em microarqueobotânica no Brasil se concentram sobretudo em sítios arqueológicos localizados nas regiões Sul e Sudeste (*e.g.*: BOYADJIAN, 2007, 2012; BOYADJIAN *et al.*, 2016a, 2016b; WESOLOWSKI, 2007; WESOLOWSKI *et al.*, 2010; CORTELETTI, 2012; PEREIRA, 2013; FLORES, 2015; CORTELETTI *et al.*, 2016; GARDIMAN *et al.*, 2016; ORTEGA, 2019), com trabalhos seminais nas regiões Amazônica e Meio-Norte (CASCON, 2009, 2010; GOMES, 2008; HILBERT *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2018; WATLING *et al.*, 2015, 2017, 2018). Não cabe aqui discorrer sobre todas essas importantes pesquisas, mas os primeiros projetos são destacados a seguir.

As primeiras análises múltiplas[6] foram realizadas a partir de amostras de cálculo dentário (tártaro). Coordenadas inicialmente pelo Dr. Karl Reinhard (UNL/EUA), em colaboração com pesquisadoras da Fiocruz e da USP (REINHARD *et al.*, 2001; WESOLOWSKI, 2007; WESOLOWSKI, *et al.*, 2010; BOYADJIAN, 2007; BOYADJIAN *et al.*, 2007; BOYADJIAN & EGGERS, 2014), logo essas pesquisas seriam levadas também ao Museu Nacional (BOYADJIAN, 2012; BOYADJIAN *et al.*, 2016a, 2016b).

No quadro dessas colaborações, Wesolowski estudou, em seu doutorado, a relação entre dieta e saúde bucal através da análise de grão de amido e fitólitos de amostras de cálculos dentários de 32 indivíduos de quatro sambaquis do norte de Santa Catarina (Morro do Ouro, Enseada, Forte Marechal Luz e Itacoara) com cronologia entre 4030±40

[6] Consiste na aplicação de protocolos que permitam a recuperação de múltiplas categorias de microvestígios simultaneamente a partir de uma única amostra (COIL *et al.*, 2003).

e 550±55 anos AP (WESOLOWSKI, 2007; WESOLOWSKI *et al*., 2010). Entre as diferentes séries estudadas, houve diferenças na diversidade de tipos de grânulos de amido e fitólitos observados, mas se nota que amido foi encontrado em todas elas, apontando para um alto consumo de vegetais amiláceos (incluindo cará, pinhão e, possivelmente, milho, batata-doce e plantas da família do inhame). Além disso, a autora observou que as maiores frequências de cáries tinham associação positiva com as maiores concentrações de amido no cálculo. Wesolowski também encontrou amido modificado, sugerindo o cozimento ou outras formas de preparo do alimento.

No mesmo ano, Boyadjian (2007) defendeu pesquisa de mestrado realizada com 86 amostras de cálculo de dois sambaquis, um do Sul (Jabuticabeira-II, SC) e outro do Sudeste (Moraes, SP), na qual testou um novo protocolo. Os resultados dos testes indicaram que a nova técnica era eficiente para a recuperação de microvestígios (BOYADJIAN *et al*., 2007), mas foi posteriormente observado que sua utilização em material frágil não é recomendada (KUCERA *et al*., 2011). Uma expressiva concentração de grãos de amido foi observada nas amostras de ambos os sítios, enquanto fitólitos foram observados em poucas delas. Os dados apontaram, ainda, maior consumo de plantas amiláceas em Moraes, sítio que também apresentava maior prevalência de cáries (BOYADJIAN, 2007; BOYADJIAN & EGGERS, 2014).

As análises em Jabuticabeira-II seriam retomadas e expandidas logo em seguida, já em parceria com o Museu Nacional, através da pesquisa de doutorado de Boyadjian (2012). Os resultados mostraram uma grande variedade de morfotipos de grãos de amido e fitólitos nas amostras estudadas, indicando que a porção vegetal da dieta do grupo fora variada e continha muitas plantas amiláceas (BOYADJIAN, 2012). A identificação dos vestígios apontou consumo de plantas semelhantes às indicadas no estudo de Wesolowski (2007), com poucas diferenças (BOYADJIAN *et al*., 2016a). Boyadjian também verificou grãos de amido danificados (cerca de 20%), que indicam o preparo do alimento por cocção ou processos mecânicos como maceração ou moagem. Além disso, a identificação de 5 grupos de diatomáceas encontradas nas amostras reafirmou o uso de recursos da paleolaguna próxima ao sítio.

Esses trabalhos demonstram, através de evidências diretas, que as plantas também desempenhavam papel importante na alimentação dos sambaquianos, ainda que o consumo de peixes e moluscos pudesse predominar. Sugeriu-se, inclusive, que pelo menos alguns desses grupos pudessem viver em um sistema de economia mista, no qual pesca e coleta de moluscos seriam complementadas pela coleta de vegetais e, talvez, até horticultura (BOYADJIAN *et al*., 2016a).

Outra pesquisa pioneira na área, desenvolvida na mesma época e também com material proveniente da região Sul do Brasil, foi o doutorado de Corteletti (2012). Ele analisou 14 fragmentos cerâmicos de duas estruturas de cocção domésticas do sítio Bonin (SC), datadas em torno de 1280 e 1420 cal. AD e 1280 e 1400 cal. AD. Ele extraiu e analisou grãos de amido e fitólitos, encontrando evidência de plantas que podem ou não ser domesticadas e de plantas domesticadas, como milho, mandioca, abóbora, cará e leguminosas. De acordo com o autor, esses dados mostram que a dieta vegetal era variada e que eles praticavam a produção de alimento mais de 100 anos antes da chegada dos Europeus, associando-a com a caça, pesca e coleta. O autor ainda infere que esses resultados, em conjunto com outras evidências, indicam o sedentarismo e a emergência da complexidade social entre populações proto-Jê meridionais (CORTELETTI *et al*., 2016).

MICROARQUEOBOTÂNICA NO MUSEU NACIONAL

O Laboratório de Arqueobotânica e Paisagem (LAP/MN), fundado em 3 de janeiro de 2012, faz parte do Programa de Pós-Graduação em Arqueologia do Museu Nacional (PPGArq/MN). Este laboratório se originou de um grupo de pesquisas em Antracologia que atua no Museu Nacional desde maio de 2002, coordenado pela Dra. Scheel-Ybert. Entre 2008 e 2011, já incorporando a microarqueobotânica, essa equipe integrou o Laboratório de Paleoecologia Vegetal (LAPAV), vinculado tanto ao Departamento de Antropologia quanto ao Departamento de Geologia e Paleontologia do Museu Nacional, sob dupla coordenação.

Os primeiros estudos microarqueobotânicos envolvendo essa equipe se relacionaram à já mencionada pesquisa de doutorado de C. Boyadjian, sob co-orientação de R. Scheel-Ybert, e deram início, a partir de 2008, a uma longa parceria.

No mesmo ano, a partir das pesquisas desenvolvidas por Cascon (2009, 2010), estudos microarqueobotânicos começam a ser desenvolvidos efetivamente no Museu Nacional em parceria com outras instituições (USP, INPA, Museu Paraense Emilio Goeldi e *Universidad de Tucuman*). Em monografia de especialização, Cascon (2009) testou diversos protocolos para obtenção de microvestígios a partir de plantas atuais e de distintos tipos de amostras arqueológicas. Esse trabalho serviu como base para sua pesquisa de mestrado, focada na Amazônia Central, no qual montou uma coleção de referência de microvestígios voltada à investigação do uso de plantas no passado da região e também recuperou e analisou microvestígios de fragmentos cerâmicos e sedimento do Sítio Hatahara (2.250 a 1.590 anos AP). Os resultados demonstraram uma grande variedade de microvestígios, sugerindo que o consumo de vegetais foi diversificado ao longo da ocupação do sítio. Foram identificados vestígios de palmeiras e de espécies cultivadas, como o milho e o cará, mas ao contrário do que se esperava, não foram encontrados grãos de amido de mandioca (CASCON, 2010).

Mais recentemente, o LAP/MN também vinha desenvolvendo pesquisas sobre microvestígios provenientes de artefatos líticos (MOREIRAS, 2015; PARANAGUÁ *et al.*, 2014). Em seu mestrado, Rodrigo Moreiras (2015) realizou análises microarqueobotânicas exploratórias em quatro zoólitos da reserva técnica de Arqueologia do Museu Nacional, para investigar se as depressões comuns nesse tipo de artefato proveniente de sambaquis teriam sido utilizadas para o processamento ritualístico de plantas. Ele aplicou protocolo que possibilitou a extração de microvestígios da superfície dessas peças sem causar danos a elas. Os resultados foram positivos para a presença de vestígios botânicos, indicando o uso dos artefatos para o processamento de plantas. Uma concentração muito mais elevada de microvestígios na superfície da concavidade dos artefatos em relação a suas faces opostas atestam que os microvestígios encontrados não provinham dos sedimentos circundantes, e sim estavam relacionados ao uso dos mesmos. Moreiras (2015) também sugere que marcas de queima nos fitólitos e danos nos grãos de amido observados poderiam indicar o processamento de vegetais por maceração e torra e que o produto resultante poderia ter sido inalado diretamente a partir da concavidade do zoólito, ainda que reconheça que mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese.

Por volta da mesma época, Boyadjian ministrou, pela primeira vez, o curso "Arqueologia de microvestígios botânicos", disciplina que passou a ser oferecida regularmente pelo PPGArq/MN. Também retomou os estudos de cálculo dentário no LAP/MN com a colaboração de instituições de outros estados e estrangeiras. Nos últimos anos, foram realizados testes para a padronização de protocolos para este tipo de pesquisa (BOYADJIAN et al., 2014), e está em andamento a análise de amostras de cálculo de

indivíduos enterrados no sítio Lapa do Santo, na região de Lagoa Santa (BOYADJIAN *et al.*, 2016b).

A elaboração de coleções de referência também é parte fundamental do desenvolvimento de pesquisas em áreas como a microarqueobotânica, pois elas possibilitam identificações taxonômicas mais confiáveis. Assim, para se firmar neste campo, além das análises de microvestígios arqueológicos, o LAP/MN está empenhado, desde o início de seu estabelecimento, na preparação e curadoria de uma fitoliteca e de uma amidoteca[7] e no desenvolvimento de um banco de dados para estes microvestígios (SCHEEL-YBERT *et al.*, 2014). Parte dos dados já disponíveis foram obtidos através da pesquisa de mestrado de Casallas (2012) – que trabalhou com fitólitos de gramíneas – e do doutorado de Boyadjian (2012) – que analisou amido de plantas diversas. Mais recentemente havia sido firmado um acordo de cooperação entre o Museu Nacional e a EMBRAPA, por meio do qual já tinham sido obtidas mais de 500 amostras que estavam em processo de preparação e análise para incremento das coleções do LAP/MN (SCHEEL-YBERT & BOYADJIAN, 2018).

Além dos estudos mencionados acima e de outros que foram desenvolvidos ao longo dos anos, o LAP/MN também tem se empenhado em pesquisas de base com plantas atuais voltadas tanto para o preparo das coleções de referência quanto para melhorar a detecção e identificação dos microvestígios arqueológicos. Elas incluem o desenvolvimento de protocolos para facilitar a extração e análise das partículas, e experimentos para verificar as modificações causadas nos grãos de amido pelos métodos de preparo dos alimentos (*e. g.* LETIERES *et al.*, 2016; AGRA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019).

No entanto, todos esses esforços foram abalados pelo incêndio ocorrido em 2018. O material e infraestrutura para pesquisas em microarqueobotânica no LAP/MN foram perdidos, incluindo coleções arqueológicas, didáticas e de referência, equipamentos de processamento e análise, biblioteca, etc. Em consequência, trabalhos que estavam em andamento foram interrompidos e não podem mais ser finalizados. Dentre eles, alguns já apresentavam resultados preliminares que serão apresentados a seguir.

ESTUDOS RECENTES NO MUSEU NACIONAL: MICROVESTÍGIOS DE CÁLCULO DENTÁRIO DO SÍTIO ARQUEOLÓGICO CAIXA D'ÁGUA (BURITIZEIRO, MG)

Descoberto em 1987, devido a uma obra de saneamento do Município de Buritizeiro, centro-norte do estado de Minas Gerais, esse sítio ficou conhecido como sítio "Caixa D'Água" (SILVA, 2015). Ele se localiza à margem esquerda do Rio São Francisco, em altura em relação ao rio, não sendo atingido pelas grandes cheias, e data de 9750± 60 AP (11250-11090 cal AP) para os níveis mais profundos e 5130 ± 50 AP (5990-5960 cal AP) para os níveis do Holoceno médio. Esse sítio tem grande importância para a investigação sobre a ocupação do território brasileiro, mas também por ser um dos poucos sítios a céu aberto bem preservados na região (COUTINHO, 2007; PROUS & RODET, 2009; SILVA, 2015).

Nos anos 2000, escavações sistemáticas coordenadas pelo Dr. Prous e a Dra. Rodet (MHNJB/UFMG) revelaram mais de 40 sepultamentos humanos com acompanhamentos funerários, como pontas feitas de osso de mamíferos e outros objetos (PROUS & RODET, 2009; PROUS *et al.*, 2011a; SILVA, 2015). Esses sepultamentos estavam concentrados em uma camada datada de 6.100 a 5.000 anos AP e os remanescentes humanos apresentavam bom estado de preservação (COUTINHO, 2007; ALVES, 2010). Tipos variados de

[7] É relevante mencionar que, atualmente, também existem outras iniciativas para o preparo de coleções de referência como estas em outras instituições brasileiras e em outros departamentos do próprio Museu Nacional (*e.g.*: FREITAS *et al.*, 2018; RICARDO *et al.*, 2018).

artefatos líticos também foram encontrados acompanhando sistematicamente cada sepultamento, como lascas produzidas em seixos de quartzito, lâminas de machado polidas e mós produzidos em grandes placas de arenito arcosiano (rocha encaixante do rio nesse setor) (RODET *et al*., 2008; PROUS & RODET, 2009; PROUS *et al*, 2011; SILVA, 2015).

A localização do sítio e a presença de vestígios de peixes, alguns deles com marcas de queima, sugerem que o grupo associado a ele tenha recorrido à pesca para obtenção de alimento, além da caça e da coleta de plantas (SILVA, 2015). Para obtenção de recursos, o grupo tinha acesso, além do rio, ao cerrado, às matas de galeria nas margens do próprio Rio São Francisco e às veredas que estão presentes na região (SILVA, 2015).

Estudos de microarqueobotânica já foram aplicados ao sítio Caixa D'Água. O primeiro deles, ainda inédito, foi uma análise preliminar de fitólitos obtidos a partir de sedimento, realizada pelo Dr. J. Iriarte na Universidade de Exeter, Inglaterra (IRIARTE, 2008). Posteriormente, sob direção do Dr. F. Freitas no Lacicor-UFMG, foi realizada uma análise preliminar de grãos de amido recuperados de artefatos líticos interpretados como mós (PROUS *et al*., 2011a, 2011b, 2012). As amostras foram obtidas por meio de raspagem da superfície de oito peças e observadas sob microscópio de luz transmitida e microscópio eletrônico de varredura. Os grãos de amido foram encontrados somente na superfície de trabalho das mós e não no sedimento que as recobria imediatamente, confirmando que esses microvestígios não provinham dos níveis superiores de depósito sedimentar e, portanto, que tais instrumentos foram utilizados para processamento de plantas. O estudo indica que alguns dos grãos de amido observados podem ser provenientes de plantas cultivadas, como mandioca e milho (PROUS *et al*., 2011b).

No LAP/MN, foi realizada outra frente de investigação interessante para recuperação de informações sobre os hábitos desse grupo e os recursos botânicos explorados: a análise de conteúdo de cálculos dentários. Ela é apresentada a seguir.

Material e Métodos

Para a realização do estudo, 14 amostras de cálculo foram extraídas dos dentes de indivíduos de oito sepultamentos do sítio Caixa D'Água, transferidas para microtubos previamente esterilizados e levadas ao laboratório. Antes do processamento das amostras, medidas rígidas de limpeza e preparo de soluções foram aplicadas para evitar contaminação das bancadas, vidrarias e demais utensílios com microvestígios atuais, existentes no ambiente, ou mesmo antigos, provenientes do preparo de outras amostras (CROWTHER *et al*., 2014; BOYADJIAN, 2018: 6).

O tratamento do cálculo se deu a partir dos protocolos apresentados por Wesolowski e colaboradores (2010) e Boyadjian (2012), com algumas adaptações, visto que tais amostras apresentavam natureza um pouco diferente daquelas para as quais os protocolos foram desenvolvidos: os fragmentos de cálculo do sítio Caixa D'Água eram menores, mais leves e se dissolviam mais rapidamente do que os de indivíduos de sambaquis. Assim, optou-se por utilizar uma concentração menor de ácido clorídrico, reagente responsável pela dissolução da matriz do cálculo. O protocolo utilizado encontra-se em anexo.

Após o processamento, com a solução final obtida de cada amostra foram preparadas lâminas de microscopia óptica. Cada uma delas foi montada com 10µl da solução e 10µl de glicerol 25%, coberta com lamínula e selada com esmalte incolor. Então, essas lâminas seguiram para análise sob microscópio Zeiss Axioscope A1, equipado com filtro de luz polarizada e uma Axiocam. Os microvestígios foram registrados, classificados e contabilizados.

Amostras controle foram processadas junto com a bateria de amostras de cálculo. Tratavam-se de microtubos vazios aos quais foram aplicados exatamente os mesmos protocolos utilizados para o tratamento químico, a montagem de lâminas e a análise das amostras de cálculo. Sujeitas às mesmas condições ambientais (de laboratório) e aos mesmos procedimentos que as amostras experimentais, tais amostras permitiriam a detecção de contaminantes que poderiam causar o enviesamento dos resultados. A avaliação dessas amostras revelou raríssimas partículas contaminantes, a maioria das quais fibras e fragmentos vegetais provenientes do papel toalha utilizado no laboratório e nenhum grão de amido, grão de pólen ou esporo de fungo. Isso comprova que as medidas tomadas para evitar a contaminação foram eficientes.

Resultados e Discussão

Os resultados apresentados a seguir são preliminares e se baseiam nas análises de 6 das 14 amostras inicialmente obtidas para este estudo. Infelizmente, os dados referentes às demais amostras foram perdidos no incêndio. Isso então corresponde a uma pequena amostra de indivíduos no universo de mais de 40 sepultamentos que foram escavados deste sítio, no entanto os dados são muito promissores. Por isso, é da maior importância que novas amostras sejam coletadas para dar continuidade à investigação.

Uma síntese dos resultados obtidos é apresentada na tabela 1, em que constam os dados das 6 amostras, e na tabela 2, contendo os números e distribuição dos microvestígios recuperados a partir de cada uma.

Tabela 1 - Dados das amostras analisadas de cálculo dentário do sítio Caixa D'Água (Buritizeiro, MG).

amostra	Sep.	Dentes*
MPI14	II	Incisivo Inferior Indet.
MPI15	IV	28
MPI17	V	45
MPI18	XI	17
MPI31	IV	32
MPI32	XII	18

*dentes dos quais foram retiradas as amostras de cálculo processadas no presente estudo.

Tabela 2 - Microvestígios encontrados nas amostras de cálculo de indivíduos do sítio Caixa D'Água (Buritizeiro, MG).

amostra	Sep.	Am.	AmDan	Fit.	Pol.	TecVeg	Esp.	Indet.	TOTAL
MPI14	II	9	4	7	-	5	-	3	28
MPI15	IV	11	2	6	-	-	-	-	19
MPI17	V	6	4	4	1	-	-	2	17
MPI18	XI	2	-	-	-	1	-	3	6
MPI31	IV	6	1	5	-	1	4	5	22

MPI32	XII	3	2	6	-	-	-	8	19
	TOTAL	37	13	28	1	7	4	21	111

Legenda: Sep.= sepultamento; Am.= grãos de amido; AmDan = grãos de amido severamente danificados; Fit. = fitólitos; Pol. = grãos de pólen; TecVeg = fragmentos de tecido vegetal; Esp.= esporos de fungo; Indet. = microvestígios que não puderam ser classificados.

O conteúdo de microvestígios recuperados de amostras de cálculo desse sítio é variado, pois além de amido e fitólitos, foram encontrados pólen, fragmentos de tecido vegetal, esporos de fungo e partículas de origem indeterminada. Ao todo, foram recuperados 111 microvestígios, dentre os quais 50 grãos de amido (incluindo os muito danificados) e 28 fitólitos. A confirmação da classificação e a identificação dos fitólitos e demais partículas ainda não foram realizadas e, portanto, não serão tratadas aqui.

Apenas treze grãos de amido observados (26%) estavam muito danificados a ponto de não ser possível identificá-los, mas a maioria dos grãos apresentou algum grau de dano, mesmo que leve. Isso pode estar relacionado ao processo de digestão do amido, que se inicia já na boca, através da mastigação e da ação da amilase salivar, ou podem ser grãos de plantas amiláceas processadas para o consumo, mas que resistiram ao preparo do alimento. A possibilidade de que isso seja resultado de processos tafonômicos também não pode ser completamente descartada, uma vez que o processo de formação do cálculo relacionado com a preservação dos microvestígios em seu interior ainda não é inteiramente compreendido.

Entre os 13 grãos muito danificados, alguns são fraturados/rachados, o que pode ser resultado de pressão mecânica em processos como moagem, por exemplo, e grãos parcialmente gelatinizados, resultado de aquecimento. Há, ainda, grãos que apresentam uma depressão profunda em sua região central, como se tivessem sido escavados, característica que também pode ser relacionada a moagem e que foi observada em outros trabalhos (BABOT, 2003; VINTON *et al.*, 2009).

Os grãos de amido menos danificados puderam ser classificados inicialmente em 12 morfotipos distintos (Tabela 3). O número de morfotipos nos permite uma aproximação do número de plantas na dieta (HENRY *et al.*, 2014:46), ainda que essa relação não seja tão direta (BOYADJIAN, 2012). Neste caso, podemos deduzir que a dieta dos indivíduos do sítio Caixa D'Água talvez não fosse muito variada, pois alguns dos morfotipos de grãos de amido observados parecem pertencer a um mesmo grupo de plantas, assim como alguns dos outros microvestígios ainda não analisados. Há estudos que reportam uma diversidade bem maior de morfotipos do que foi observado aqui (BOYADJIAN, 2012; MICKLEBURGH & PAGÁN-JIMÉNEZ, 2012), ainda que o número de amostras analisadas nesses estudos também seja maior. Contudo, em análise semelhante feita com o mesmo número de amostras, Chinique de Armas e colaboradores (2015) recuperaram número maior de grãos de amido, mas uma diversidade de morfotipos muito menor do que no sítio Caixa D'Água. De todo o modo, a realização de uma análise mais aprofundada e o estudo detalhado dos outros microvestígios são necessários para que essa questão seja devidamente verificada.

Tabela 3 - Distribuição dos morfotipos de grãos de amido encontrados no cálculo de indivíduos do sítio Caixa D'Água (Buritizeiro, MG).

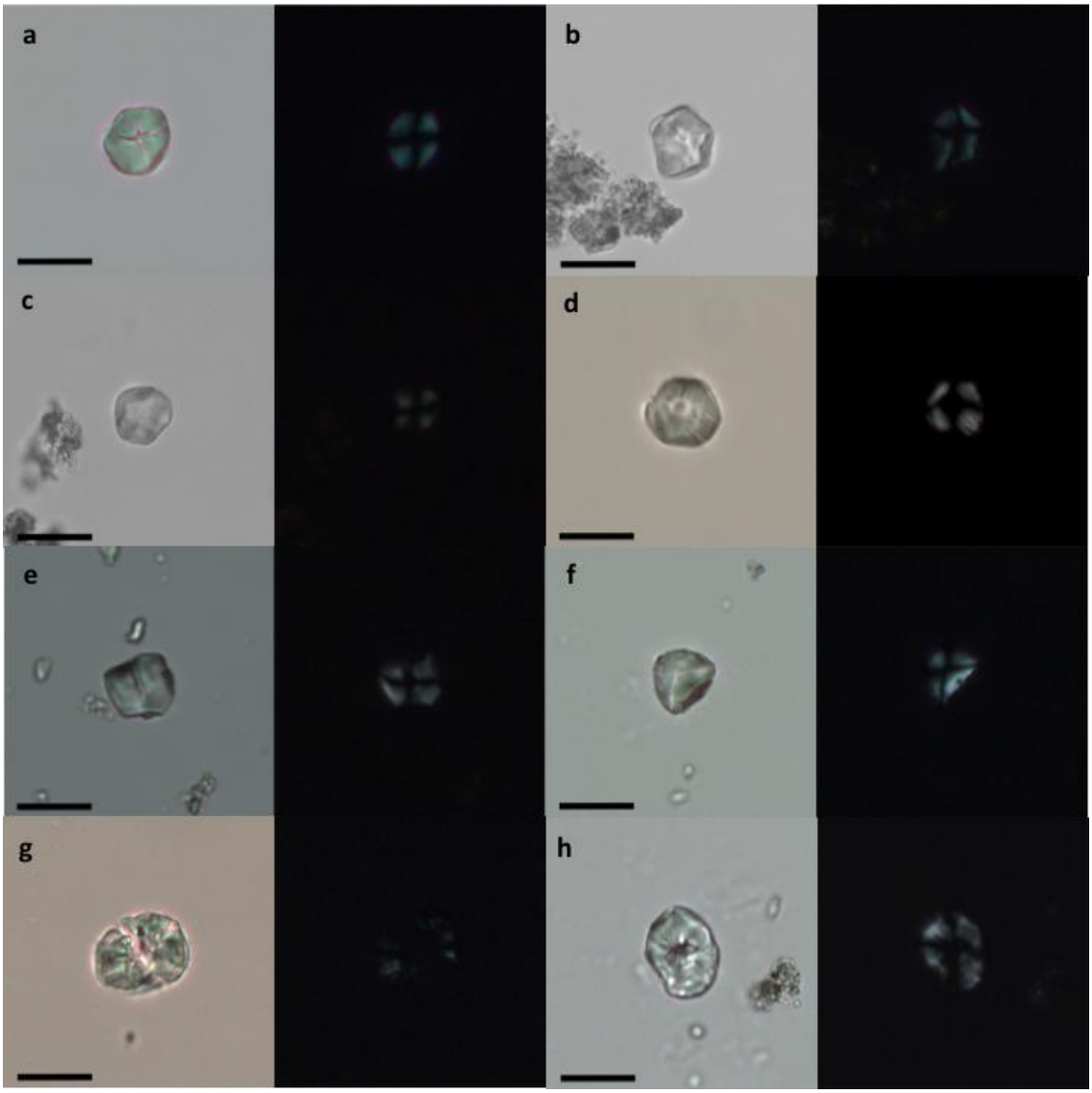
		Morfotipos												
amostra	Sep.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	TOTAL
MPI14	II	1	2	2	2	1	1							9

MPI15	**IV**	1	1					3	2	1	2	1		11
MPI17	**V**			1							2	2	1	6
MPI18	**XI**			1				1						2
MPI31	**IV**		1			1					2	1	1	6
MPI32	**XII**			2						1				3
	TOTAL	**2**	**4**	**6**	**2**	**2**	**1**	**4**	**2**	**2**	**6**	**4**	**2**	**37**

Com base nessa análise preliminar, é possível dizer que alguns dos morfotipos observados são semelhantes aos produzidos por alguns grupos de plantas da família Poaceae (gramíneas), alguns deles possivelmente de milho. Muitos dos grãos encontrados não têm características muito diagnósticas de uma família ou gênero botânicos e, portanto, não é possível determinar sua origem. Uma análise mais detalhada, incluindo a identificação dos microvestígios, será apresentada em breve.

Na figura 1 estão alguns dos grãos de amido observados nas amostras desse estudo.

Figura 1 - Alguns grãos de amido extraídos das amostras de cálculo dentário do sítio Caixa D'Água (Buritizeiro, MG). Fotos obtidas sob aumento de 400x em campo claro (esq.) e sob luz polarizada (dir.): a) morfotipo 1 – MPI14; b) morfotipo 2 – MPI14; c) morfotipo 4 – MPI14; d) morfotipo 10 – MPI31; e) morfotipo 11 – MPI15; f) morfotipo 12 – MPI17; g) e h) grãos de amido com danos severos. Escala = 20*µm*.



ESTUDOS RECENTES NO MUSEU NACIONAL: MICROVESTIGIOS EM CACHIMBOS HISTORICOS (RJ)

O centro da cidade do Rio de Janeiro passou por uma remodelação para as Olimpíadas de 2016. Nas obras, diversos vestígios arqueológicos foram resgatados nas escavações ao longo das ruas cariocas. Dentre eles encontravam-se 56 fragmentos de cachimbos e piteiras com os mais diversos entalhes e formatos que denotam a diversidade presente no Rio oitocentista. Alguns desses cachimbos estavam próximos a estruturas de combustão relacionadas à prática de cozinhar em grupo nessa região (GASPAR *et al.*, 2015).

O resgate dessas peças permitiu à nossa equipe elaborar um projeto que visava aplicar técnicas de microarqueobotânica para compreender as práticas fumatórias no passado da cidade. Preliminarmente, buscou-se investigar se nos cachimbos havia a presença de vestígios de uso, o que poderia ter sido prejudicado, a princípio, devido às dificuldades de preservação de restos botânicos impostas pelo clima tropical (LEMA *et al.*, 2015). Em paralelo a essa primeira análise, foi realizada uma ampla contextualização histórica sobre o período a que essas peças pertenceram, o que possibilitou compreender a sociedade em que o uso desses artefatos ocorria e, de acordo com a bibliografia (DÓRIA, 1958; NARDI, 1987; AGOSTINI, 2009; SAAD, 2011), o que poderia ter sido fumado (BARROS, 2018). Num segundo momento, seriam realizadas análises mais profundas e identificações das amostras de macro e microvestígios botânicos para confirmar as plantas utilizadas e verificar se havia diferenças entre os tipos de cachimbos quanto ao seu conteúdo.

Análise Microarqueobotânica Preliminar

Os cachimbos recuperados foram separados em tipos de acordo com seu material de produção e sua morfologia:

- Tipo 1: argila marrom; com entalhes lineares (9 peças/fragmentos).
- Tipo 2: argila marrom; robustos e sem entalhes (5 peças/fragmentos).
- Tipo 3: argila preta; robustos e com entalhes geométricos diversos (11 peças/fragmentos).
- Tipo 4: caulim; sem entalhes no fornilho e com entalhes nas piteiras (32 peças/fragmentos).

Para os estudos microarqueobotânicos, foram separados 28 fragmentos dos quais foram coletadas amostras de sedimento aderido interna e externamente aos cachimbos. Métodos não agressivos ou destrutivos para as peças, descritos por Torrence (2006) e Lema *et al.* (2015), foram selecionados para a coleta. Como os cachimbos apresentavam diferenças morfológicas, foi necessária uma pequena adaptação dos métodos, de acordo com a peculiaridade das peças.

Ao todo foram obtidos três tipos de amostras: amostra experimental 1 (AE1), coletada através de leve raspagem do conteúdo interno; amostra experimental 2 (AE2), coletada mediante lavagem das paredes internas; e amostra de controle (AC), coletada por meio de leve raspagem do sedimento aderido às paredes externas.

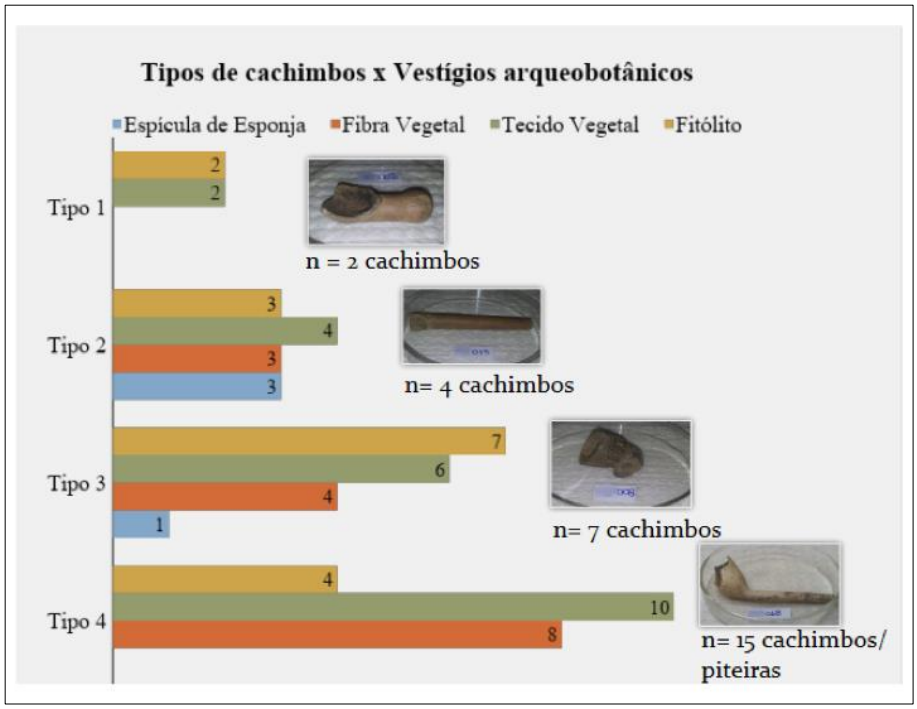
As amostras AE1 e AE2, do interior do cachimbo, seriam utilizadas para a detecção e análise dos microvestígios das plantas utilizadas como fumo. Já as amostras AC, do exterior das peças, serviriam como controle para verificação de microvestígios de plantas não relacionadas ao fumo que pudessem estar presentes no sedimento do sítio arqueológico. Estas poderiam conter, ainda, vestígios de plantas provenientes de outras atividades que estariam aderidas de forma não intencional ao cachimbo devido à sua

manipulação. Os testes preliminares para detecção dos microvestígios foram realizados com amostras AE2 e as demais amostras foram armazenadas para análises que seriam realizadas em breve.

Para melhorar a visualização de possíveis microvestígios nas amostras AE2, foi necessário um período de testes para clareamento. Assim, a amostra referente à peça V001 foi selecionada e dela extraiu-se 900µl, dos quais foram obtidas três subamostras de 300µl transferidas com pipeta de precisão para três microtubos. A cada subamostra, adicionou-se 300µl de um dos seguintes reagentes químicos: ácido lático, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. Observou-se, então, a forma como cada subamostra reagiu ao longo de 4, 24 e 48 horas. A cada um desses intervalos de tempo foram montadas lâminas com 30µl de cada amostra que foram observadas sob microscópio óptico AxioPlan da Zeiss, em aumento de 400x. Ao fim das 48 horas de testes, o ácido lático se mostrou o reagente menos agressivo às amostras e aquele que proporcionou uma significativa melhora na visualização do material montado em lâmina.

Prosseguiu-se, então, com a análise das amostras AE2 das demais peças. Lâminas foram montadas com 15µl de amostra AE2 mais 15µl de solução de ácido lático. Elas foram cobertas com lamínula, que foi selada com esmalte incolor e então seguiram para a análise microscópica. Foi constatada a presença de diversos microvestígios que poderiam indicar o uso dessas peças para o fumo (Figura 2), dentre eles alguns fitólitos, fibras e tecidos vegetais. Nenhum grão de amido foi encontrado. Nas peças elaboradas com argila preta, além dos vestígios de plantas, foi constatada a presença de espículas de esponja, que poderiam ser provenientes do local onde a argila utilizada para a fabricação dos cachimbos teria sido obtida. Tais amostras seriam identificadas em colaboração com o Departamento de Invertebrados do Museu Nacional.

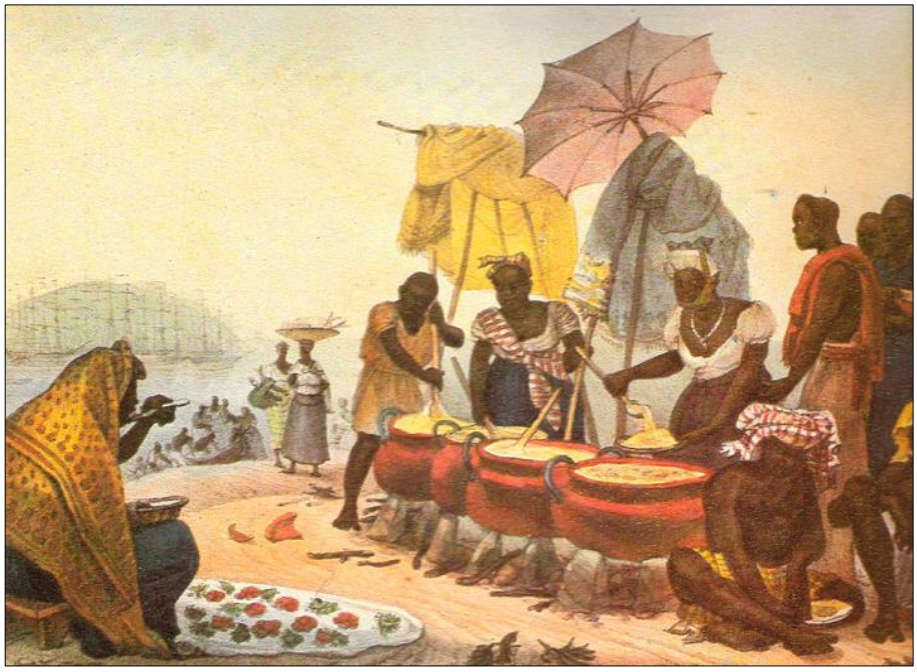
Figura 2 - Relação entre a morfologia dos cachimbos e tipos de microvestígios encontrados.



Uma observação a olho nu das amostras AE1 revelou a presença de carvões vegetais em 8 peças, sendo 3 cachimbos de caulim e 5 cachimbos de argila marrom e preta, que poderiam ser analisadas em pesquisas antracológicas (SCHEEL-YBERT, 2018). Como alguns dos cachimbos foram encontrados próximos a vestígios de fogueiras que eram

elaboradas em vias públicas (Figura 3), os carvões poderiam revelar as plantas utilizadas como material combustível no século XVIII e XIX na cidade do Rio de Janeiro (DEBRET, 1982; GASPAR *et al*., 2015).

Figura 3 - Debret, J. B. Negras vendedoras de Angu. 1835.



A segunda parte da pesquisa, que buscaria identificar quais eram as ervas utilizadas para o fumo, não pôde ser realizada em decorrência do incêndio que destruiu as amostras.

Análise Historiográfica

A análise historiográfica realizada em paralelo à análise microarqueobotânica preliminar teve como principais fontes: os fragmentos de cachimbos, os relatos de viajantes que passaram pela cidade do Rio de Janeiro de meados do século XVIII ao XIX, algumas pinturas que retratam o cotidiano dessa cidade à época (DEBRET, 1982; RUGENDAS, 1998) e os Códigos de Postura, nos quais eram publicadas normatizações para todas as camadas sociais (BRASIL, 1830; BRASIL, 1854). Constatou-se que as práticas fumatórias estavam presentes nas ruas da cidade do Rio de Janeiro e duas ervas eram usadas com recorrência para o fumo: o tabaco e a maconha (BARROS, 2018), sendo que a maconha, ou "pito do pango", era expressamente proibida na cidade desde 1830 (BRASIL, 1830; DÓRIA, 1958; SAAD, 2011).

A prática de fumar se dava de forma diferente entre os diferentes grupos sociais. Enquanto o tabaco poderia estar mais relacionado aos indivíduos brancos que viviam no Rio de Janeiro, as autoridades do período associavam a maconha à população escravizada. As pinturas históricas analisadas evidenciaram cenas da cidade do Rio de Janeiro que permitiram reflexões sobre como essa prática ocorria relacionada a momentos de socialização e lazer, nos quais indivíduos negros conversavam, jogavam ou descansavam ao ar livre, sendo que as ruas da cidade aparecem como importantes espaços desses momentos (Figura 4). O uso do fumo pela parcela branca da população, pouco representado nas obras analisadas, pode ter ocorrido principalmente em uma esfera privada da vida social, como o interior das casas (BARROS, 2018).

Tais conclusões, obtidas por intermédio da análise histórica, dialogam com os cachimbos resgatados próximos à estrutura de combustão e mostram como a prática fumatória se inseria na urbe carioca.

Figura 4 - Rugendas, J. M. Jogar capoeira. 1835.

Os vestígios de uso, assim como as peças utilizadas para o fumo e as representações realizadas pelos viajantes, permitiram o acesso às diversas camadas da população. Tanto indivíduos negros quanto brancos se encontram representados nessas fontes, o que permitiu a construção de um olhar diverso sobre o período. A análise microarqueobotânica e historiográfica das práticas fumatórias apontou um caminho para conhecer o cotidiano dos africanos e afro-brasileiros escravizados, libertos e livres que viviam em meio ao intenso movimento presente nas ruas da cidade do Rio de Janeiro.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Microarqueobotânica ainda é uma linha de pesquisa relativamente jovem no Brasil e, por isso, ainda há um vasto campo a ser explorado. Decerto existem desafios pela frente. Por exemplo, devido à grande biodiversidade brasileira, ainda há grupos botânicos sobre os quais se sabe muito pouco sobre a produção de fitólitos e sobre a morfologia e características dos grãos de amido, o que torna imperativa a produção de coleções de referência, trabalho de base fundamental para o desenvolvimento da disciplina.

Outra questão importante é que, junto com a necessidade de expansão dos grupos de pesquisa em microarqueobotânica no Brasil, existe também a necessidade do estabelecimento de laboratórios adequados para o processamento de amostras, sejam elas modernas ou antigas. Esses espaços devem conter não somente microscópios e equipamentos que permitam a aplicação de diferentes protocolos de extração, mas instalações adequadas para o bom funcionamento desses equipamentos e que facilitem a manutenção do ambiente de modo a minimizar o risco de contaminação das amostras, o que, infelizmente, nem sempre está ao alcance da maioria dos pesquisadores da área (CROWTHER *et al*., 2014).

No entanto, apesar destas limitações, a microarqueobotânica fornece uma imensa riqueza de dados e permite a recuperação de vestígios em sítios nos quais antes as informações eram limitadas, tendo, portanto, grande potencial para ajudar a responder questões cruciais a respeito do passado de nosso país.

O Museu Nacional, à medida que abriga um dos poucos grupos de pesquisa brasileiros na área, vinha tendo papel fundamental nessa empreitada ao promover o treinamento e formação de pesquisadores em microarqueobotânica, o desenvolvimento de protocolos diversos e a aplicação desse tipo de pesquisa em contextos variados. O trabalho da equipe, duramente prejudicado pelo incêndio, está, neste momento, voltado à reconstituição das coleções de referência microbotânicas e à aquisição de equipamentos e instalações. Espera-se, dentro em breve, também retomar as pesquisas com material arqueológico.

AGRADECIMENTOS:

À Dra. Maria Dulce Gaspar, por nos ceder os cachimbos analisados no segundo estudo apresentado neste artigo. À Dra. Gabriela Musaubach, pelo esclarecimento de algumas dúvidas e ajuda com o resumo em Espanhol. Agradecemos também a(o) revisor(a) anônimo(a), pelas correções e sugestões apontadas no manuscrito. As pesquisas do Laboratório de Arqueobotânica e Paisagem do Museu Nacional foram apoiadas por projetos da CAPES, FAPERJ e CNPq. Rita Scheel-Ybert é bolsista de produtividade do CNPq e Cientista do Nosso Estado pela FAPERJ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, Camila. 2009. Cultura material e a experiência africana no sudeste oitocentista: cachimbos de escravos em imagens, histórias, estilos e listagens. *Topoi* 10 (18): 39-47.

AGRA, Mariana da Silva; LETIERES, Brisa; BOYADJIAN, Celia H.C. & SCHEEL-YBERT, Rita. 2017. Grãos de amido de milheto, arroz, quinoa e amaranto: Contribuição para uma coleção de referência de amido visando análises arqueobotânicas. *8ª Semana de Integração Acadêmica (SIAC)*, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ALEXANDRE, Anne; MEUNIER, Jean-Dominique; MARIOTTI, Andre & SOUBIES, Francois.1999. Late Holocene Phytolith and Carbon-Isotope Record from a Latosol at Salitre, South-Central Brazil. *Quaternary Research*, 51(2): 187-194. https://doi.org/10.1006/qres.1998.2027.

ALVES, T. M. 2010. Cultura e Tecnologia: Um estudo tecnomorfológico sobre as industrias líticas lascadas do sítio arqueológico Buritizeiro/ Minas Gerais, entre 1000AP e 2000AP. *Dissertação de Mestrado*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. 115pp.

BABOT, Maria del Pilar. 2003. Starch grain damage as an indicator of food processing. In: HART, D. M. & WALLIS, L. A. (Eds.) *Phytolith and starch research in the Australian-Pacific-Asian regions: the state of the art.* Canberra, Pandanus Books, pp. 69-81.

BALL, Terry; CHANDLER-EZELL, Karol; DUNCAN, Neil; DICKAU, Ruth; HART, Thomas C.; IRIARTE, Jose; LENTFER, Carol; LOGAN, Amanda; LU, Houyuan; MADELLA, Marco; PEARSALL, Deborah M.; PIPERNO, Dolores R.; ROSEN, Arlene M.; VRYDAGHS, Luc; WEISSKOPF, Alison & ZHANG, Jianping. 2016. Phytoliths as a tool for investigations of agricultural origins and dispersal around the world. *Journal of Archaeological Science* 68: 32-45. https://doi.org/10.1016/j.jas.2015.08.010

BARROS, Anelise Martins de. 2018. O QUE OS CACHIMBOS NOS CONTAM? Práticas fumatórias na cidade do Rio de Janeiro de fins do Século XVIII ao XIX. *Trabalho de Conclusão de Curso*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 14pp.

BARTON, Hugh & MATTHEWS, P. J. 2006. Taphonomy. In: TORRENCE, R. & BARTON, H. (Eds.). *Ancient Starch Research*. California, Left Coast Press, pp. 75-94.

BEHLING, Hermann. 1996. First report on new evidence for the occurrence of *Podocarpus*and possible human presence at the mouth of the Amazon during the Late-glacial. *Vegetation History and Archaeobotany* 5:241-246.

BISSA, Walter M.; DIAS, Adriana S. & CATHARINO, Eduardo L.M. 2009 Reconstituição paleoclimática do vale do Rio Caí, nordeste do Rio Grande do Sul, com ênfase nas ocupações humanas. *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia* 19:143-154.

BOYADJIAN, Célia H.C. 2007. Microfósseis contidos no cálculo dentário como evidência do uso de recursos vegetais os sambaquis de Jabuticabeira II (SC) e Moraes (SP). *Dissertação de Mestrado*. São Paulo, Universidade de São Paulo. 147pp.

BOYADJIAN, C.H.C. 2012. Análise e identificação de microvestígios vegetais de cálculo dentário para a reconstrução de dieta sambaquieira: estudo de caso de Jabuticabeira II, SC. *Tese de Doutorado*. São Paulo, Universidade de São Paulo. 232pp.

BOYADJIAN, Célia H.C.; EGGERS, Sabine & REINHARD, Karl J. 2007 Dental wash: a problematic method for extracting microfossils from teeth. *Journal of Archaeological Science* 34:1622-1628.

BOYADJIAN, Célia. H. C. & EGGERS, Sabine. 2014. Micro-Remains Trapped in Dental Calculus Reveal Plants Consumed by Brazilian Shell Mound Builders. In: Roksandic, M., Mendonça de Souza, S.M.F., Eggers, S., Burchell, M. & Klökler, D. (Eds.) *The cultural dynamics of shell-matrix sites.* University of New Mexico Press. pp179-188.

BOYADJIAN, Celia H.C., POWER, Robert, SUNCOVAS, V, LEONARD, Chelsea, SCHEEL-YBERT, Rita & HENRY, Amanda. 2014. Primeiro estudo sistemático sobre os efeitos causados por diferentes métodos de extração de microrrestos de cálculo dentário. In: Del Puerto, L.; Korstanje, A. & Inda, H. (orgs.) *Taller "Micropaleoetnobotanica: Relevância de una red interdisciplinaria de investigaciones en fitólitos y almidones"*. La Paloma, Uruguay. Libro de Resúmenes pp27-29.

BOYADJIAN, Celia H.C.; EGGERS, Sabine; REINHARD, Karl J. & SCHEEL-YBERT, Rita. 2016a. Dieta no sambaqui Jabuticabeira II: consumo de plantas revelado por microvestígios provenientes de cálculo dentário. *Cadernos do LEPAARQ* 13:132-161.

BOYADJIAN, Celia H.C.; OLIVEIRA, Rodrigo; SCHEEL-YBERT, Rita & STRAUSS, André. 2016b. Micro-remains trapped in dental calculus from Lapa do Santo, Brazil. *Workshop on the Analysis of Microscopic Particles in Archaeological Samples (WAMPAS)* 6-8 December, Leipzig, Alemanha.

BOYADJIAN, Célia. 2018. Plant Micro-remains in Dental Calculus. In: Smith C. (eds) *Encyclopedia of Global Archaeology*. Springer, Cham https://doi.org/10.1007/978-3-319-51726-1_3200-1

BRASIL. 1830. Código de posturas da ilustríssima Câmara municipal do Rio de Janeiro.

BRASIL. 1854. *Código de posturas da ilustríssima Câmara municipal.* Rio de Janeiro: Emp. Typ. Dous de Dezembro P. Brito, Impressor da Casa Imperial. 249pp. Disponível em: https://digital.bbm.usp.br/handle/bbm/3880

BRYANT Jr, Vaughn. M & HOLLOWAY, Richard G. 1983. The role of palynology in archaeology. *Advances in Archaeological Method and Theory* 6:191-224. https://www.jstor.org/stable/20210068

CALEGARI, Marcia Regina. 2008. Ocorrência e significado paleoambiental do horizonte A húmico em latossolos. *Tese de Doutorado*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo. 259pp.

CAMPOS, Antonio C. de & LABOURIAU, Luiz F. G. 1969. Corpos Silicosos de Gramíneas dos Cerrados. II. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 4:143-151.

CASALLAS, Jorge M. M. 2012. Constituição de uma coleção de referência arqueobotânica: o estudo de fitólitos como janela para o passado. *Dissertação de Mestrado*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CASCON, Leandro M. 2009. Pequenas Grandes Permanências: métodos e técnicas para a construção de coleções de referencia e extração de grãos de amido e outros microvestígios de diversos contextos. *Monografia de conclusão de curso*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 91pp.

CASCON, Leandro M. 2010. Alimentação na floresta tropical: Um estudo de caso no sítio Hatahara, Amazônia Central, com base em microvestígios botânicos. *Dissertação de mestrado*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 203pp.

CAVALCANTE, Paulo B. 1968. Contribuição ao Estudo dos Corpos Silicosos das Gramíneas Amazônicas I. Panicoideae (Melinideae, Andropogoneae e Tripsaceae). *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi,* série Botânica, 30: 1-11.

CHAVES, Sergio A.M. 2001. Estudo palinológico de coprólitos pré-históricos holocênicos coletados na Toca do Boqueirão do Sítio da Pedra Furada. Contribuições paleoetnológicas, paleoclimáticas e paleoambientais para a região sudeste do Piauí - Brasil. *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia* 10: 103-120.

CHAVES, Sergio A.M. 2002. História das caatingas: a reconstituição paleoambiental da região arqueológica do Parque Nacional Serra da Capivara através da Palinologia. *FUMDHAMentos*, São Raimundo Nonato, 2(2): 85-103.

CHAVES, Sergio A. M. & REINHARD, Karl 2006. Critical Analysis of Coprolite Evidence of Medicinal Plant Use, Piauí, Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 237: 110-118.

CHINIQUE DE ARMAS, Y.; BUHAY, W.M.; RODRÍGUEZ SUAREZ, R.; BESTEL, S.; SMITH, D.; MOWAT, S. D. & ROKSANDIC, M. 2015. Starch analysis and isotopic evidence of consumption of cultigens among fisheregatherers in Cuba: The archaeological site of Canímar Abajo, Matanzas. *Journal of Archaeological Science* 58: 121-132. https://doi.org/10.1016/j.jas.2015.03.003.

COE, Heloisa G. 2009. Fitólitos como indicadores de mudanças na vegetação xeromórfica da região de Búzios/Cabo frio, RJ, durante o Quaternário. *Tese de Doutorado*. Rio de Janeiro, Universidade Federal Fluminense. 340p.

COIL, James; Korstanje, Maria Alejandra; ARCHER, Steven & Hastorf, Christine A. 2003. Laboratory goals and considerations for multiple microfossil extraction in archaeology. *Journal of Archaeological Science* 30:991-1008.

CORTELETTI, Rafael. 2012. Projeto Arqueológico Alto Canoas - Paraca: um estudo da presença Jê no planalto catarinense. *Tese de Doutorado*. São Paulo, Universidade de São Paulo. 342pp.

CORTELETTI, Rafael.; DICKAU, Ruth.; DeBLASIS, Paulo. & IRIARTE, José. 2016. Analises de grãos de amido e fitólitos nas terras altas do sul do Brasil: repensando a economia e mobilidade dos grupos proto-Jê meridionais. *Cadernos do LEPAARQ*, 13 (25):163-196.

COSTA, Filipe Gomes Cardoso Machado, da; BOVE, Claudia Petean, ARRUDA Rosane do Carmo Oliveira & PHILBRICK, Thomas. 2011. Silica Bodies and their Systematic Implications at the Subfamily Level in Podostemaceae. *Rodriguésia*. 62(4): 937-942.

COUTINHO, Raquel 2007. "O Homem de Buritizeiro", *Minas faz Ciência*, Revista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), 31: 26-29.

CRISTIANI, Emanuela; RADINI, Anita; BORIĆ, Duša; ROBSON, Harry K; CARICOLA, Isabella; CARRA, Marialetizia; MUTRI, Giuseppina; OXILIA, Gregorio; ZUPANCICH, Andrea; ŠLAUS, Mario & VUJEVIĆ, Darip. 2018. Dental calculus and isotopes provide direct evidence of fish and plant consumption in Mesolithic Mediterranean. *Nature: Scientific Reports* http://doi.org/10.1038/s41598-018-26045-9

CROWTHER, alison; HASLAM, Michael; OAKDEN, Nikki; WALDE, Dale & MERCADER, Julio. 2014. Documenting contamination in ancient starch laboratories. *Journal of Archaeological Science* 49: 90-104.

DEBRET, Jean Baptiste. 1982. Viagem pitoresca e histórica ao Brasil. 2ª ed. São Paulo, Círculo do Livro.

DEL PUERTO, Laura. & INDA, Hugo. 2003. Análisis de silicofitolitos de la matriz sedimentaria del sitio Cg14e01, Rocha (Uruguay). *Revista de La Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 32(2): 103-112.

DEL PUERTO, Laura.; KORSTANJE, Maria Alejandra & INDA, Hugo (eds.) 2014. *Taller "Micro paleoetnobotánica: Relevancia de una red interdisciplinaria de investigaciones en fitolitos y almidones"*. La Paloma, Uruguay.

DICKAU, Ruth.; RANERE, Anthony J. & COOKE, Richard G. 2007. Starch grain evidence for the preceramic dispersals of maize and root crops into tropical dry and humid forests of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(9): 3651-3656.

DÓRIA, Rodrigues. 1958. Os fumadores de maconha: efeitos e males do vício. In: Ministério da Saúde, Serviço Nacional de Educação Sanitária, Maconha: coletânea de trabalhos brasileiros. 2ª ed. Rio de Janeiro, Oficinas Gráficas do IBGE, pp.1-14, [orig. 1915].

DUDGEON, John. V. & TROMP, Monica. 2012. Diet, Geography and Drinking Water in Polynesia: Microfossil Research from Archaeological Human Dental Calculus, Rapa Nui

(Easter Island). *International Journal of Osteoarchaeology*. 24(5):634-648. https://doi.org/10.1002/oa.2249

ERRA, Georgina. 2010. Asignación Sistemática y Paleocomunidades Inferidas a Partir del Estudio Fitolíticode Sedimentos Cuaternarios de Entre Ríos, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica,* 45(3-4): 309-319.

FAEGRI, Knut & IVERSEN, Johs. 1989. *Text-Book of Pollen Analysis*. 4a ed. New York, John Wiley e Sons. 328pp.

FIGUEIREDO, Rita de C. L. & HANDRO, Walter. 1971. Corpos silicosos de gramíneas dos Cerrados- V In: III Simpósio sobre o cerrado. Anais da Universidade de São Paulo, São Paulo. 215-230.

FLORES, R. A. 2015. Uso de recursos vegetais em Lapa Grande de Taquaraçu: evidências macro e microscópicas. *Dissertação de Mestrado*. São Paulo, Universidade de São Paulo.

FREITAS, Aline G.; GARCÍA, José S.C.; JIMÉNEZ, Santiago F.; PEDROZA, Igor; CAROMANO, Caroline F.; CASCÓN, Leandro M.; BIANCHINI, Gina F., DA SILVA, Sergio F. S. M., GHETTI, Neuvania C. & DE OLIVEIRA, CLAUDIA A. 2015. Manejo y cultivo de plantas en sierras Húmedas del NE de Brasil Ca. 670-530 BP: evidencias palinológicas del yacimiento evaristo I. *SAGVNTVM (P.L.A.V.)* 47: 203-231. http://doi.org/10.7203/SAGVNTVM.47.6433

FREITAS, Aline; NASCIMENTO, Ana L. M. L. do; LAGE, Maria C. S. M.; MORAES, Lucio A. de; FILHO, Paulo S. P.; REIS, Robéria L. 2018. Piauí de plantas e gentes: construção de coleções de referência de plantas úteis / econômicas como base para estudos arqueobotânicos. *Revista do Laboratório de Arqueologia e Paleontologia da UEPB.* ISSN 2179 – 8168.

FREITAS, Fabio. O. 2002 Uso de grãos de amido na identificação e análise de materiais arqueológicos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento,* 23. 26pp.

FREITAS, Fabio. O. 2004 Uso de material arqueológico no estudo de evolução de plantas - estudo de caso: milho - *Zea mays* L. e mandioca - *Manihot esculenta* CRANTZ. *Revista de arqueologia*, 17: 33-40.

GARDIMAN, Gilberto G.; RODRIGUES, Igor M.M.; CASCON, Leandro M. & ISNARDIS, Andre. 2016. A morfologia dos vasos Jê na produção de cauim de milho em Vereda III: uma proposição. *Revista do Museu Arqueologia e Etnologia*, 27: 111-120.

GASPAR, Maria D.; BARBOSA, Debora & BIANCHINI, Gina. 2015. Recôncavos e convexos: Africanos e crioulos da Baía de Guanabara. sécs. XVIII - XIX . In: CHEVITARESE, A. L.; GOMES, F. S (org.). Entre pedaços e camadas: Histórias e arqueologias do Rio de Janeiro século XVIII - XXI. 1ª ed. Rio de Janeiro, 7 Letras, pp.38 - 50.

GOMES, Denise M.C. 2008. O Uso Social da Cerâmica de Parauá, Santarém, Baixo Amazonas: uma análise funcional. *Arqueología Suramericana*, 4: 4-33.

GOTT, Beth; BARTON, Huw; SAMUEL, Delwen & TORRENCE, Robin. 2006. Biology of starch. In: TORRENCE, R. & BARTON, H. (Eds.). *Ancient Starch Research*. California, Left Coast Press Inc, 2006. pp.35-45.

HALBRITTER, Heidemarie; ULRICH, Silvia; GRÍMSSON, Friogeir; WEBER, Martina; ZETTER, Reinhard; HESSE, Michael; BUCHNER, Ralf; SVOJTKA, Matthias & FROSCH-RADIVO, Andrea. 2018. *Illustrated Pollen Terminology*. 2ª ed. Springer Open, Cham. 483 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6_1

HANDRO, Walter. 1995. Luiz Fernando Goivêa Labouriau (1921-1996). *Acta Botanica Brasilica* 9(1):193-197.

HARDY, Karen & KUBIAK-MARTENS, L. 2015. *Wild Harvest: Plants in the hominin and pre-agrarian human worlds*. Oxbow books, United Kingdom. pp.215-240.

HART, Thomas C. 2016. Issues and directions in phytolith analysis. *Journal of Archaeological Science*, 68: 24-31. https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.03.001.

HASLAM, Michael. 2004. The decomposition of starch grains in soils: implications for archaeological residue analyses. *Journal of Archaeological Science*, 31:1715-1734. https://doi.org/10.1016/j.jas.2004.05.006.

HENRY, Amanda G.; HUDSON, Holy F. & PIPERNO, Dolores R. 2009. Changes in Starch grain morphologies from cooking. *Journal of Archaeological Science*, 36: 915-922.

HENRY, Amanda G.; BROOKS, Alison S.; & PIPERNO, Dolores R. 2014. Plant foods and dietary ecology of Neanderthals and early modern humans. *Journal of Human Evolution*, 69:44-54. https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2013.12.014.

HILBERT, Lautaro; NEVES, Eduardo G.; PUGLIESE, Francisco; WHITNEY, Bronwen S.; SHOCK, Myrtle; VEASEY, Elizabeth; ZIMPEL, Carlos A. & IRIARTE, J. 2017. Evidence for Mid-Holocene Rice Domestication in the Americas. *Nature Ecology & Evolution*, 1: 1693-1698.

ICSN. *The International Code for Starch Nomenclature*. 2011. Disponível em: www.fossilfarm.org?ICSN?Code.html , acessado em 30/08/2019.

IRIARTE, Jose. 2008. *Preliminary phytolith analysis from Buritizeiro, Minas Gerais, Brazil*. Relatório particular não publicado.

IRIARTE, Jose & BEHLING, Hermann. 2007. The expansion of Araucaria forest in the southern Brazilian highlands during the last 4000 years and its implications for the development of the Taquara/Itararé tradition. *Environmental Archaeology* 12(2): 115-127.

IRIARTE, Jose; HOLST, Irene; MAROZZI, Oscar; LISTOPAD, Claudia; ALONSO, Eduardo; RINDERKNECHT, Andrés & MONTAÑA, Juan. 2004. Evidence for cultivar adoption and emerging complexity during the mid-Holocene in the La Plata basin. *Nature*, 432(7017): 614-617.

IRIARTE, Jose & DICKAU, Ruth. 2012. Las culturas del maíz? Arqueobotánica de las sociedades hidráulicas de las Tierras Bajas Sudamericanas. *Amazônica*, 4(1):30-58.

KORSTANJE, Maria Alejandra & BABOT, Maria del Pilar. 2007. A microfossil characterization from South Andean economic plants. In: MADELLA, M. & ZURRO D. (Eds.) *Plants, People and Places: Recent studies in phytolithic analysis*. Cambridge, Oxbow Books, pp.41-72.

KUCERA, Matthias; PANY-KUCERA, Doris; BOYADJIAN, Celia H.C.; REINHARD Karl J. & EGGERS, Sabine. 2011. Efficient but destructive: a test of the dental wash technique using secondary electron microscopy. *Journal of Archaeological Science*, 38:129–135. http://doi.org/10.1016/j.jas.2010.08.019

LABOURIAU, Luiz G. 1983. Pjytolith Work in Brazil, a mini review. *The Phytolitharien newsletter*, 2(2): 6-10.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L. & COX, Michael M. 1993. *Principles of Biochemistry*. 2ª ed. New York, Worth Publisher Inc. 1090pp.

LEMA, Veronica S.; ANDREONI, Diego; CAPPARELLI Aylen; ORTIZ, Gabriela.; SPANO, Romina; QUESADA, Marcos & ZORZI, Flavia. 2015. Protocolos y avances enelestudio de residuos de pipas arqueológicas de Argentina. Aportes para el entendimiento de metodologíasactuales y prácticas pasadas. *Estudios Atacameños*, 51:77-97. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-10432015000200006

LETIERES, Brisa; BARROS, Anelise; BOYADJIAN, Celia H. C. & SCHEEL-YBERT, Rita. 2016. Grãos de amido de milho, feijão, amendoim e sorgo: Contribuição para uma coleção de referência de amido visando análises arqueobotânicas. *7ª Semana de Integração Acadêmica (SIAC),* Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LUZ, Leandro D.; KALINOVSKI, Elaine C.Z.; PAROLIN, Mauro & SOUZA Fo, Edvard, E. de. 2015. Estágio Atual do Conhecimento sobre Fitólitos no Brasil. *Terræ Didatica*, 11(1):52-64. https://www.ige.unicamp.br/terraedidatica/v11_1/PDF11-1/111-%206-102.pdf.

MADELLA, Marco.; ALEXANDRE, A. & BALL, Terry. 2005 International Code for Phytolith Nomenclature 1.0. *Annals of Botany*, 96:253-260. https://doi.org/10.1093/aob/mci172.

MICKLEBURGH, Hayley L. & PAGAN-JIMENEZ, Jaime R. 2012. New insights into the consumption of maize and other food plants in the pre-Columbian Caribbean from starch grains trapped in human dental calculus. *Journal of Archaeological Science* 39:2468-2478.

MOREIRAS, R. 2015. Voando alto: uma abordagem micropaleoetnobotânica sobre a possível função dos zoólitos. *Dissertação de mestrado*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 126pp.

MULHOLLAND, Susan C. & RAPP Jr., Jorge. 1992. *Phytolith Systematics an introduction*. In: Rapp Jr., Jorge & Mulholland, Susan, C. (Eds.). Phytolith Systematics. Advances in Archaeological and Museum Science, vol 1. Springer, Boston, MA, pp1-13. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1155-1_1

MUSAUBACH, Maria G.; PLOS, Anabela & BABOT, Maria del Pilar. 2013. Differentiation of archaeological maize (Zea mays L.) from native wild grasses based on starch grain morphology. Cases from the Central Pampas of Argentina. *Journal of Archaeological Science*, 40:1186-1193. http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2012.09.026

NARDI, Jean-Baptiste. 1987. *O fumo no Brasil colônia*. São Paulo, Editora Brasiliense. 75pp.

OKUDA, A. & TAKAHASHI, E. 1964. The Effect of Various Amounts of Silicon Supply on the Growth of the Rice Plant and Nutrient Uptake, Part 3. *Journal of the Science of Soil and Manure*, 32: 533-537.

ORTEGA, Daniela D. 2019. Microvestígios botânicos em artefatos líticos do sítio Lapa do Santo (Lagoa Santa, Minas Gerais). *Dissertação de Mestrado*. São Paulo, Universidade de São Paulo. 243pp.

PARANAGUÁ, Yann; CASALLAS, Jorge M.M.; BOYADJIAN, Celia H.C. & SCHEEL-YBERT, Rita. 2014. Contribuição para a definição de metodologias de estudo de microvestígios em artefatos líticos: O caso do sambaqui de Cabeçuda (SC, Brasil). In: Del Puerto, L.; Korstanje, A. E Inda, H. (coords.) *Taller "Micropaleoetnobotanica: Relevância de una red interdisciplinaria de investigaciones en fitólitos y almidones"*. Resumo extendido. La Paloma, Uruguai. pp.110-111 ISBN 978-9974-99-753-0

PEARSALL, Deborah M. 1978. Phytolith analysis of archaeological soils: evidence for maize cultivation in Formative Ecuador. *Science*, 199:177-178.

PEARSALL, Deborah. M. 2015. Paleoethnobotany: A handbook of Procedures. 3ª ed. California, Left Coast Press. 513 pp.

PEREIRA, Gilson L. 2013. Ocupação pré-histórica do litoral norte gaúcho: um olhar sobre o invisível. *Dissertação de Mestrado*. Porto Alegre. PUC do Rio Grande do Sul.

PERRY, Linda. 2004. Starch analyses reveal the relationship between tool type and function: an example from the Orinoco Valley of Venezuela. *Journal of Archaeological Science* 31(8): 1069-1081.

PERRY, Linda; SANDWEISS, Daniel H.; PIPERNO, Dolore R.; RADEMAKER, Kurt; MALPASS, Michael A.; UMIRE, Adán. & DE LA VERA, Pablo. 2006. Early maize agriculture and interzonal interaction in southern Peru. *Nature*, 440(2): 76-79.

PIPERNO, Dolores R. 1983. The applications of phytolith analysis to the reconstruction of plant subsistence and environments in prehistoric Panama. *Tese de Doutorado*. Phyladelphia, Temple University, EUA.

PIPERNO, Dolores R. 1984. A Comparison and Differentiation of Phytoliths from Maize and Wild Grasses: Use of Morphological Criteria. *American Antiquity* 49:361-383.

PIPERNO, Dolores R. 1988. *Phytolith analysis: An archaeological and geological perspective*. San Diego, Academic Press. 280pp.

PIPERNO, Dolores R. 2006. *Phytoliths: A Comprehensive Guide for Archaeologists and Paleoecologists*. Lanham, AltaMira Press. 237pp.

PIPERNO, Dolores R. 2011. The Origins of Plant Cultivation and Domestication in the New World Tropics: Patterns, Process, and New Developments. *Current Anthropology*, 52(4); S453-S470. https://www.jstor.org/stable/10.1086/659998

PIPERNO Dolores R. & BECKER Peter. 1996. Vegetational History of a Site in the Central Amazon Basin Derived from Phytolith and Charcoal Records from Natural Soils. *Quaternary Research*, 45(2):202-209. https://doi.org/10.1006/qres.1996.0020.

PIPERNO, Dolores R. & HOLST, Irene. 1998. The presence of starch grains on prehistoric stone tools from the humid neotropics: indications of early tuber use and agriculture in Panama. *Journal of Archaeology Science*, 25(8): 765-776. https://doi.org/10.1006/jasc.1997.0258

PIPERNO, Dolores R.; RANERE, Anthony J.; HOLST, Irene & HANSELL, Patricia. 2000. Starch grains reveal early root crop horticulture in the Panamanian tropical forest. *Nature*, 407: 894-897.

PLANELLA, Maria T.; BELMAR, Carolina; QUIROZ, Luciana & ESTÉVEZ, Daniela. 2012. Propuesta integradora para un estudio del uso de plantas con propiedades psicoactivas en pipas del período alfarero temprano y sus implicancias sociales. *Revista Chilena de Antropología*, 25: 93-119. http://doi.org/10.5354/0719-1472.2012.20294

POWER, Robert C., ROSEN, Arlene M. & NADEL, Dani. 2014. The economic and ritual utilization of plants at the Raqefet Cave Natufian site: The evidence from phytoliths. *Journal of Anthropological Archaeology* 33:49-65. https://doi.org/10.1016/j.jaa.2013.11.002.

PROUS, Andre & RODET, Maria J. 2009. Os vivos e os mortos no Brasil tropical e sub tropical pré-histórico. In: Fagundes Morales, Walter. & Prado Moi, Flávia. (Org) *Cenários Regionais em Arqueologia Brasileira*, 1ª ed. São Paulo, Annablume pp.11-43.

PROUS, André ; RODET, Maria J. J. & LIMA, Ângelo P. 2011a. Les vivants et leurs morts: évocation des rites funéraires dans la préhistoire brésilienne (12 000-500 BP). In: Denis Vialou. (Org.). Peuplements et préhistoire en amériques. 1ed. Paris, Éditions du CTHS, pp.393-406.

PROUS, Andre; RODET, Maria J.; FREITAS, Fabio; ROCHA, Selma O.; SOUZA, Luiz A.; PÁDUA, Gabriel S. 2011b. Amidos Pré-Históricos em mós de Buritizeiro/MG: abordagem arqueobotânica no cemitério do Holoceno Médio. Pôster. *UFMG Conhecimento e Cultura*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais.

PROUS, A.; FREITAS, F.; CRUZ SOUZA, L.A.; RODET, M.; ROCHA, S.O.G. & PÁDUA, G.S. 2012. Amidos Pré-Históricos em mós do Sítio Arqueológico Caixa D'água, de Buritizeiro/Mg: abordagem Arqueobotânica no Cemitério do Holoceno Médio. Anais do 2º Seminário de Pós-Graduação em Ciência e Conservação - História da Arte Técnica 2(1): 186–192.

RASBOLD Giliane G.; MONTEIRO, Mayara R; PAROLIN, Mauro; CAXAMBÚ Marcelo G. & PESSENDA Luiz C.R. 2011. Caracterização dos Tipos Morfológicos de Fitólitos Presentes em Butia paraguayensis (Barb. Rodr.) L. H. Bailey (Arecaceae). *Iheringia,* série Botânica, 66(2):265-270.

REINHARD, Karl J.; SOUZA, Sheila F.M.; RODRIGUEZ, C; KIMMERLE, Erin & S. DORSEY-VINTON. 2001. Microfossils in dental calculus: A new perspective on diet and dental disease. In: E. Williams (Ed.) *Human Remains: Conservation, retrieval and analysis.* Oxford, British Archaeological Report S934. pp113–118.

RICARDO, Sarah D.F.; COE, Heloisa H. G.; DIAS, Raphaella R.; DE SOUZA, Leandro A.F. & Gomes, E. 2018. Reference collection of plant phytoliths from the Caatinga biome, Northeast, Brazil. *Flora*, 249:1-8.

RODET, Maria J.; DUARTE, Debora; CUNHA, Ana C.R.; DINIZ, Lilian & BAGGIO, Hernando. 2008. *Os métodos de "fatiagem" sobre arenito/quartzito do Brasil Central – exemplo do sítio arqueológico de Buritizeiro, Minas Gerais*. *Anais do XIV Congresso da Sociedade de Arqueologia Brasileira* (SAB).

ROVNER, Irwin. 1971. Potential of opal phytoliths for use in paleoecological reconstruction. *Quaternary Research* 1(3):343-359. https://doi.org/10.1016/0033-5894(71)90070-6.

RUGENDAS, Johann M. 1998. *Viagem pitoresca através do Brasil*. Belo Horizonte; Rio de Janeiro, Itatiaia. pp.166.

SAAD, Luísa G. 2011. O discurso da Medicina na proibição da maconha: preocupações acerca da composição racial na formação de uma República exemplar. Anais do XXVI Simpósio Nacional de História – ANPUH, São Paulo.

SALGADO-LABOURIAU, Maria L. 1973. *Contribuição à palinologia dos cerrados*. Academia Brasileira de Ciências. 291pp.

SANDWEISS, Daniel H. 2007. Small is big: The Microfossil Perspective on Human-Plant Interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS),* 104(9): 3021-3022. https://doi.org/10.1073/pnas.0700225104.

SANGSTER, Allan G. 1985. Silicon Distribution and Anatomy of the Grass Rhizome, with Special Reference to Miscanthus sacchariflorus (Maxim.) Hackel. *Annals of Botany*, 55 (5): 621-634.

SCHEEL-YBERT, Rita. 2016. Arqueobotânica na América do Sul: Paisagem, subsistência e uso de plantas no passado. In: *Dossie Arqueobotânica na America do Sul*, Sheel-Ybert, R. (Org.). Cadernos do Lepaarq, 13(25): 1-14.

SCHEEL-YBERT, Rita. 2018. Anthracology: Charcoal Analysis. In: Smith C. (eds) Encyclopedia of Global Archaeology. Springer, Cham.

SCHEEL-YBERT, Rita & BOYADJIAN, C. 2018. Constituição de coleções de referência e bancos de dados visando pesquisas sobre dieta, domesticação de vegetais e produção de alimentos na pré-história brasileira. Relatório Técnico para Acordo de Cooperação Acadêmica e Intercâmbio Técnico, Científico e Cultural entre a EMBRAPA e o Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

SCHEEL-YBERT, Rita; BOYADJIAN, Celia H.C; CASALLAS, Jorge M.M & PARANAGUÁ, Yann. 2014. Los sistemas Anthrakos y Phyton: Propuesta de creación de banco de datos en linea. In: Del Puerto, L.; Korstanje, A. E Inda, H. (coords.) *Taller "Micropaleoetnobotanica: Relevância de una red interdisciplinaria de investigaciones en fitólitos y almidones"*. Resumo extendido. La Paloma, Uruguai. pp. 98-104. ISBN 978-9974-99-753-0

SENDULSKY, Tatiana & LABOURIAU, Luiz G. 1966. Corpos silicosos de gramíneas dos Cerrados - I. In: I Simpósio Sobre Cerrado, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol.38 159-170.

SHILITO, Lisa-Marie & RYAN, Philippa. 2013. Surfaces and streets: phytoliths, micromorphology and changing use of space at Neolithic Çatalhöyük (Turkey). *Antiquity* 87(337): 684-700. https://doi.org/10.1017/S0003598X00049395

SILVA, Sergio T. & LABOURIAU, Luiz G. 1970. Corpos Silicosos de Gramíneas dos Cerrados - III. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 5:167-182.

SILVA, V. M. 2015. Geoarqueologia na bacia do Rio São Francisco, Minas Gerais (sítios arqueológicos Caixa D'Agua, Biobocas II e Lapa do Sol. *Monografia de conclusão de curso*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. 115pp.

SILVA, Isabel M.O.; BOYADJIAN, Celia H.C.; SCHEEL-YBERT, Rita. 2019. Subsídio à história do cultivo da mandioca: estudo de variedades da manihot esculenta através de grãos de amido. *10ª Semana de Integração Acadêmica (SIAC)*, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SÖNDAHL, Maro R. & LABOURIAU, Luiz G. 1970. Corpos Silicosos de Gramíneas dos Cerrados - IV. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 5:183-207.

STOCKMARR, Jens. 1971. Tablets with spores used in absolute pollen analysis. Pollen 13: 615-62.

TORRENCE, Robin. 2006. Starch and Archaeology. In: TORRENCE, R. e BARTON, H. (Eds). *Ancient Starch Research*. California, Left Coast Press, pp.17-34.

TORRENCE, Robin & BARTON, Huw. 2006. *Ancient Starch Research*. California, Left Coast Press. 256pp.

UGENT, Donald; POZORSKI, S. & POZORSKI, T. 1981. Prehistoric remains of the sweet potato from the Casma Valley of Peru. *Phytologia* 49(5):401-415.

UGENT, Donald; POZORSKI, S. & POZORSKI, T. 1982. Archaeological potato tuber remains from the Casma Valley of Peru. *Economic Botany*, 36(2): 182-192.

VAL-PEÓN, Cristina; CANCELLI, Rodrigo R.; SANTOS, Luis & SOARES, Andre L.R. 2019. Prehistoric occupation and palaeoenvironmental changes along SantaCatarina's Coastal Plain, Brazil: An integrated approach based onpalynological data. *Journal of Archaeological Science: Reports* 23: 983-992.

VINTON, Sheila D., PERRY, Linda. REINHARD, Karl J., SANTORO, Calogero M. & TEIXEIRA-SANTOS, Isabel. 2009. Impact of Empire Expansion on Household Diet: The Inka in Northern Chile's Atacama Desert. *PlosONE*, 4(11):8069. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008069

WATLING, Jennifer; SAUNALUOMA, Sanna; PÄRSSINEN, Martti & SCHAAN, Denise. 2015. Subsistence practices among earthwork builders: Phytolith evidence from archaeological sites in the southwest Amazonian interfluves. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 4:541-551. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2015.10.014.

WATLING, Jennifer; IRIARTE, José; MAYLE, Francis E.; SCHAAN, Denise; PESSENDA, Luiz C.R.; LOADER, Neil J.; STREET-PERROTT, Alayne; DICKAU, Ruth E.; DAMASCENO, Antonia & RANZI, Alceu. 2017. Impact of pre-Columbian "geoglyph" builders on Amazonian forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS), 114:1868-1873. https://doi.org/10.1073/pnas.1614359114.

WATLING, Jennifer; SHOCK, Myrtle; MONGELÓ, Guilherme; ALMEIDA, Fernando; KATER, Thiago; De OLIVEIRA, P. E. & NEVES, Eduardo G. 2018. Direct archaeological evidence for Southwestern Amazonia as an early plant domestication and food production centre. *PloS ONE,* 13(7): e0199868. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199868.

WEBER, Sadie & PRICE, Max D. 2015. What the pig ate: A microbotanical study of pig dental calculus from 10th– 3rd millennium BC northern Mesopotamia. *Journal of Archaeological Science* 6:189–827. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2015.11.016.

WESOLOWSKI, Veronica; MENDONÇA DE SOUZA, Sheila M. F.; REINHARD, Karl & CECCANTINI, Gregorio. 2007. Grânulos de amido e fitólitos em cálculos dentários humanos: contribuição ao estudo do modo de vida e subsistência de grupos sambaquianos do litoral sul do Brasil. *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia*, São Paulo, 17:191-210.

WESOLOWSKI, Veronica; FERRAZ MENDONÇA DE SOUZA, Sheila. M.; REINHARD, Karl J. & CECCANTINI, Gregorio. 2010. Evaluating microfossil content of dental calculus from Brazilian sambaquis. *Journal of Archaeological Science*, 37:1326-1338. http://doi.org/10.1016/j.jas.2009.12.037

ANEXO I

Protocolo de extração de microvestígios a partir de cálculo dentário aplicado às amostras do sítio Caixa D'Água, Buritizeiro (MG)

(adaptado de WESOLOWSKI *et al.*, 2010 e BOYADJIAN, 2012)

1.1. Obtenção das amostras[8]

Os fragmentos de cálculo foram extraídos dos dentes com auxílio de uma cureta de dentista e transferidos para microtubos (tipo eppendorf®) novos, esterilizados e devidamente identificados.

1.2. Dissolução da matriz do cálculo

a. Um tablete de esporos de *Lycopodium clavatum* foi adicionado a cada microtubo com amostra;

b. Ácido clorídrico (HCl) a 4% foi adicionado a cada tubo. A dissolução dos fragmentos de cálculo e dos tabletes de licopódio pelo HCl provoca efervescência, por isso, a solução do ácido foi adicionada aos poucos, de modo a controlar a reação e evitar extravasamento do material e perda da amostra;

c. Quando a reação estava controlada, os tabletes dissolvidos e apenas poucas bolhas se formando, o volume dos microtubos foram completados (até 1,5ml) com a solução de HCl e esperou-se até que os fragmentos de cálculo estivessem dissolvidos;

1.3. Concentração e separação dos microvestígios da solução

a. As amostras foram centrifugadas a 5000 RPM por 5 minutos (3 etapas de aceleração e 0 de desaceleração);

b. Com auxilio de uma micropipeta, retirou-se o sobrenadante sem perturbar o precipitado;

c. Água destilada foi adicionada aos tubos e as amostras foram homogeneizadas;

d. Repetiu-se as etapas a, b e c;

e. Repetiu-se as etapas a e b novamente e o sobrenadante foi retirado e substituído por uma solução de álcool etílico (EtOH) a 70%;

f. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas novamente a 5000 RPM por 3 minutos;

g. O sobrenadante foi retirado de modo a não perturbar o sedimentado e deixar no microtubo apenas 50µL de solução;

1.4. Montagem das lâminas de microscopia

a. Com o auxilio de uma micropipeta, a amostra foi homogeneizada por sifonamento;

b. cada lâmina foi montada com 10µL de amostra e 10µL de glicerol 25%;

c. o material foi coberto com uma lamínula (22 x 22mm) que foi selada com esmalte incolor

d. As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz transmitida com filtro de luz polarizada e câmera para tomada de imagens.

---

[8] Antes da extração, é necessária uma limpeza prévia com escovação suave para retirada de sedimento que ainda esteja aderido ao dente e aos depósitos de cálculo. Esse sedimento pode ser transferido para microtubos e armazenado para realização de análises complementares (amostras controle). É aconselhável aplicar algum protocolo adicional para uma limpeza mais eficiente antes da extração, mas caso isso não tenha sido feito, é possível encontrar na literatura protocolos para limpeza dos fragmentos já coletados (BOYADJIAN, 2018: 6).