



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

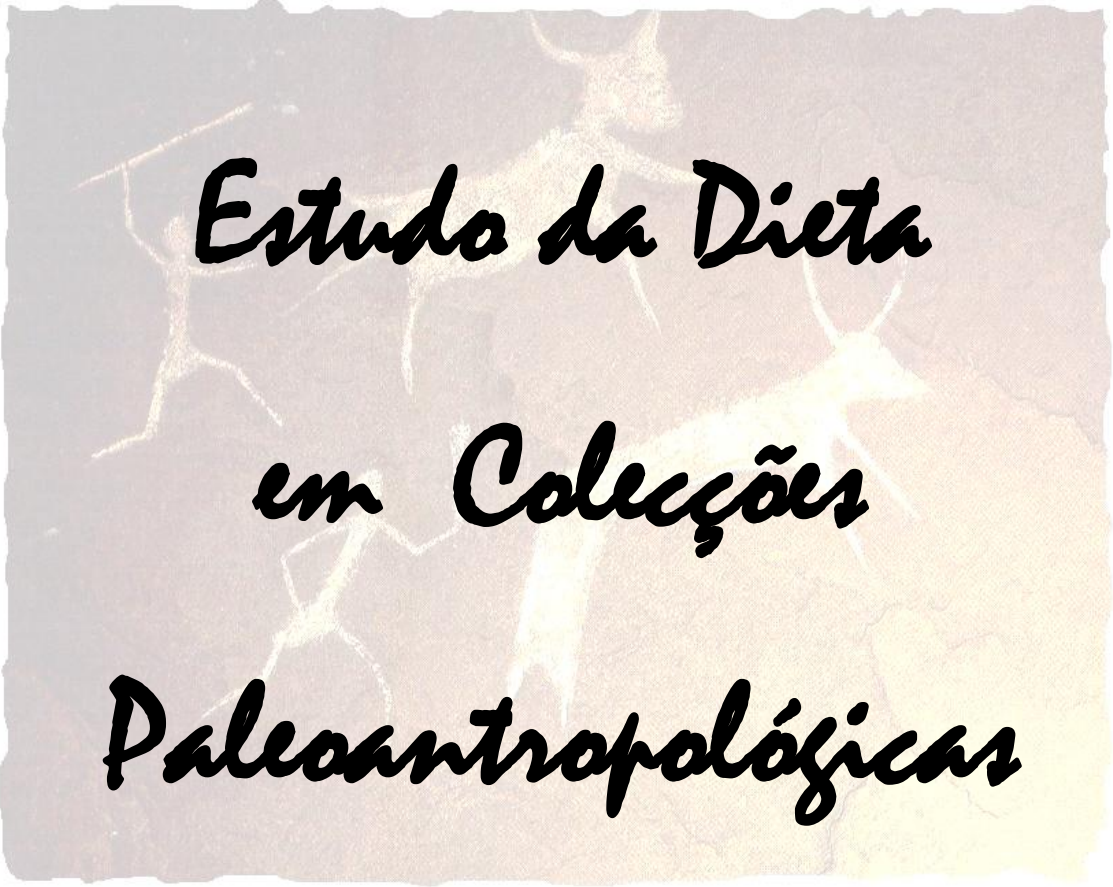
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Relatório de Estágio

de

Licenciatura em Bioquímica

Faro, Dezembro de 2001



*Estudo da Dieta
em Coleções
Paleoantropológicas*

Realizado por:

Ricardo Manuel Rafael Afonso nº 8185

Orientado por:

Nuno Ferreira Bicho

Manuel Aureliano Alves

ÍNDICE

INTRODUÇÃO

| | |
|---|-----------|
| <u>1.1- PALEOLÍTICO SUPERIOR</u> | 1 |
| <u>1.2- A IMPORTÂNCIA DA RECONSTITUIÇÃO DA DIETA</u> | 2 |
| <u>1.3- ANÁLISE DA PALEODIETA</u> | 3 |
| 1.3.1- ANÁLISE DE ELEMENTOS VESTIGIÁRIOS..... | 4 |
| <u>1.4- CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL ÓSSEO</u> | 6 |
| 1.4.1- OSSO | 6 |
| 1.4.2- DENTES | 8 |
| <u>1.5- MINERAIS E ELEMENTOS VESTÍCIAIS</u> | 9 |
| 1.5.1- CÁLCIO (CA)..... | 10 |
| 1.5.2- ESTRÔNCIO (SR)..... | 11 |
| 1.5.3- BÁRIO (BA)..... | 12 |
| 1.5.4- ZINCO (ZN)..... | 12 |
| 1.5.5- COBRE (CU)..... | 13 |
| 1.5.6- MANGANÊS (MN)..... | 13 |
| 1.5.7- SÓDIO (NA)..... | 14 |
| <u>1.6- DIAGÊNESE</u> | 14 |
| <u>2- MATERIAIS E MÉTODOS</u> | 16 |
| <u>2.1- MATERIAL</u> | 16 |
| <u>2.2- MÉTODOS EXPERIMENTAIS</u> | 19 |
| 2.2.1- ANÁLISE ELEMENTAR | 19 |
| 2.2.1.1- <i>Elemental Analyzer – E.A. 1108</i> | 19 |
| 2.2.1.2- <i>Preparação das amostras biológicas</i> | 21 |
| 2.2.2- ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA..... | 24 |
| 2.2.2.1- <i>Espectrofotômetro Varian AA-20</i> | 24 |
| 2.2.2.2- <i>Preparação das amostras</i> | 26 |
| 2.2.3- CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA..... | 27 |
| 2.2.3.1- <i>Cromatógrafo Shimadzu</i> | 28 |
| 2.2.3.2- <i>Procedimento</i> | 28 |
| <u>3- RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> | 30 |

| | |
|--|-----------|
| <u>3.1- ANÁLISE ELEMENTAR</u> | 30 |
| <u>3.2- ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA</u> | 33 |
| <u>3.2.1- ZINCO</u> | 34 |
| <u>3.2.2- BÁRIO</u> | 35 |
| <u>3.2.3- COBRE</u> | 36 |
| <u>3.2.4- SÓDIO</u> | 37 |
| <u>3.2.5- MANGANÊS</u> | 38 |
| <u>3.3- CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA</u> | 39 |
| <u>3.3.1-CÁLCIO</u> | 40 |
| <u>3.4- GRUPOS DIETÉTICOS DO HOMEM DO SÍTIO PALEOLÍTICO DA LAPA DO PICAREIRO</u> | 42 |
| <u>4- CONCLUSÕES GERAIS</u> | 44 |
| <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 46 |

1- INTRODUÇÃO

1.1- PALEOLÍTICO SUPERIOR

O clima na Europa era frio e seco durante a maior parte do Paleolítico Superior, com imenso gelo a cobrir as latitudes mais a norte. Mais a sul, dominavam as estepes, pradarias e algumas florestas, em geral havia muitas variações locais, com grandes vales e rios. Neste ambiente floresciam comunidades de grandes mamíferos, incluindo o bisonte, cavalos, renas, mamutes e auroques. Os habitantes humanos podiam explorar não só uma grande variedade de recursos animais como também vegetais que incluía nozes, avelãs e frutos silvestres (Fagan, 1998).

O clima variava constantemente, de maneira que os humanos tiveram de se adaptar, alterando a sua dieta, as estratégias de caça e recolção e a sua tecnologia. Apesar das dificuldades climáticas, o homem *sapiens sapiens* adaptou-se com sucesso a todo o tipo de ambientes, mas quando o Período Glaciar terminou (Fig. 1), surgiram novas condições, e estas trouxeram consequências para as sociedades caçador-recolectoras.

O clima mudou de frio e seco para um clima mais temperado, trazendo consigo mudanças na fauna e flora e conseqüentemente mudanças culturais do homem. A subsistência dos caçadores-recolectores é assim um assunto chave para entender as transições culturais que ocorreram na transição Plistocénio-Holocénio.

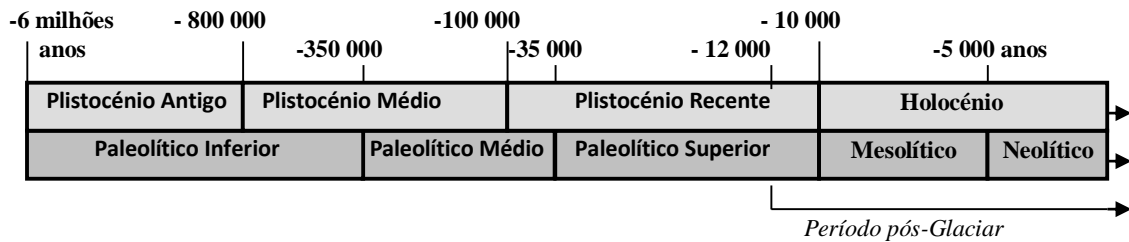


Figura 1- Cronologia dos principais períodos da pré-história, tanto os geológicos a cinzento claro, como os períodos arqueológicos a cinzento-escuro.

Em Portugal esta transição, ao contrário de outras regiões mais a norte, sofreu importantes mudanças climáticas. Durante este período ocorreu uma desagregação de espécies animais e vegetais, com a migração de espécies adaptadas ao frio para regiões mais ao norte da Península Ibérica, e a proliferação de espécies Mediterrânicas no centro e sul de Portugal (Bicho *et al*, 1999). Este período Plistocénio-Holocénio, tal como todos os períodos de transição confrontou o Homem com novos desafios, torna-se assim de especial importância para arqueólogos e antropólogos compreenderem as implicações desta transição no comportamento e cultura humana.

1.2- A IMPORTÂNCIA DA RECONSTITUIÇÃO DA DIETA

O estudo das sociedades humanas antigas, baseado sobretudo nos restos sobreviventes, visa por um lado, a recriação das culturas humanas e, por outro, a reconstrução do meio natural dos povos responsáveis por tais testemunhos arqueológicos e dos seus modos de vida (Cabral, 1996).

De todas as necessidades do homem, as mais essenciais são as relacionadas com a sua alimentação. As vidas das pessoas em qualquer lugar e em qualquer altura são profundamente influenciadas pela quantidade de comida que conseguem obter e

conservar. (Oswalt, 1986). O tipo de alimentação, sua proveniência e disponibilidade, assim como os métodos e tecnologias de as procurar podem influenciar a organização social e evolução humanas (Kevin *et al.*, 1987). A reconstrução da dieta é importante para estudar estratégias adaptativas e relações paleoecológicas entre as espécies, no fundo estabelecer o nível socioeconómico das populações passadas. No entanto no estudo da subsistência, é útil relembrar a distinção entre refeição, que são evidências directas do que as pessoas comem num dado momento, e dieta, que implica um padrão de consumo durante um longo período de tempo, ou mesmo da sua vida (Renfrew , Bahn, 1991).

1.3- ANÁLISE DA PALEODIETA

A maior parte da informação acerca da dieta provêm dos vestígios ósseos, já que os vestígios vegetais e de peixes são raros devido à sua fraca preservação (Renfrew e Bahn, 1991). Até há poucos anos, muito do nosso conhecimento acerca da paleodieta resultou da aplicação de métodos indirectos, nomeadamente as análises de cáries (reflecte uma dieta rica em carboidratos), do desgaste dentário e ainda a observação de algumas patologias ósseas associadas com a alimentação. No entanto estes métodos tornam por vezes difíceis de quantificar o tipo de alimentos consumidos. O desenvolvimento de novos métodos, como a análise de estriação dentária, análise isotópica e de elementos vestigiários constituintes do tecido ósseo, veio permitir uma determinação mais específica dos alimentos consumidos. No entanto devido a uma enorme variedade de alimentos susceptíveis de serem ingeridos pelos humanos, tornam as informações obtidas, em resultados de carácter geral, como seja o consumo de carne,

peixe e fibras (Umbelina, 1996). Existem hoje em dia uma grande variedade de técnicas que podem ser usadas para este tipo de estudos, desde o microscópio electrónico, passando pela espectroscopia de emissão e absorção, até à análise de neutrões activados. Alguns destes estudos podem ser bastante dispendiosos, por isso é preciso estabelecer os objectivos e requisitos para escolher a técnica mais eficaz, tendo em conta, por exemplo, o grau de sensibilidade, os elementos a analisar, ou a possibilidade de analisar a amostra sem a destruir.

Este trabalho, teve como principal objectivo o estudo da dieta humana no sítio Paleolítico da Lapa do Picadeiro, através da análise de elementos vestigiais (zinco, bário, cobre, sódio, cálcio e manganês) presentes em amostras de tecido ósseo com idades compreendidas entre 20 000 e 4 000 anos e tentando diferenciá-las em grupos dietéticos. Para tal foram utilizadas as técnicas de análise elementar, espectroscopia de absorção atómica e cromatografia de troca iónica

1.3.1- Análise de Elementos Vestigiários

Os organismos são constituídos por uma grande variedade de elementos químicos, principalmente carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto que representam 99 % e ainda um grande número de elementos, tais como o ferro, zinco, vanádio, cobre e flúor entre outros, chamados de vestigiários pois existem em pequenas quantidades, na ordem dos 0,01%.

A primeira tentativa de aplicar a análise de elementos vestigiários para estudar a reconstituição de dietas deve-se a Toots e Voorhies, em 1965, estes conduziram análises a concentrações de estrôncio (Sr) nos ossos de carnívoros e herbívoros do Plioceno. Os

resultados por eles obtidos, demonstraram que os ossos de carnívoros apresentavam níveis de estrôncio mais baixos do que os dos herbívoros (Elias, 1980). Por sua vez, Brown em 1973 e Schoeninger em 79, foram mais longe sugerindo que a análise dos níveis de estrôncio contido nos ossos poderia ser utilizado para saber a estrutura social de algumas populações passadas. Presumindo que as classes mais elevadas teriam mais acesso a carne do que as classes mais baixas, e estas por seu lado consumiriam mais vegetais (Kevin *et al.*, 1987).

Para além de análises dos ossos, foram feitos estudos nos dentes (esmalte). Um desses estudos foi o de Boaz e Hampel em 1978, onde foram feitas análises a dentes de vários animais, incluindo de homínídeos do Plioceno-Pleistoceno. Estas análises mostraram que não existia nenhuma correlação entre os níveis de estrôncio e a actividade herbívora, e os dentes dos homínídeos apresentavam valores de estrôncio muito diferentes uns dos outros.

Em todos estes estudos, foi fixada a atenção apenas no estrôncio existente no material ósseo. Curiosamente este elemento, não é considerado essencial à vida, no entanto sabia-se por estudos com ^{90}Sr , isótopo radioactivo do estrôncio, extremamente perigoso, que foi produzido nas explosões nucleares realizadas nos anos 50 e 60, e que a partir dessa altura começou a surgir em grandes quantidades no leite e outros alimentos, assim como no esqueleto humano. Verificou-se também que este elemento se repartia diferencialmente por vários componentes da cadeia alimentar. Porém, hoje em dia tem-se considerado vantajoso não limitar a análise a um só elemento, mas sim, alargá-la ao maior número possível deles, como o zinco, bário, cobre, entre outros (Cabral, 1996).

Esta análise de elementos vestigiais em tecidos ósseos está limitada pelo nosso ainda pequeno conhecimento dos processos pelos quais estes elementos passam da dieta para os ossos e dentes.

1.4- CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL ÓSSEO

1.4.1- Osso

Devido à rigidez e resistência do tecido ósseo, este é muitas das vezes o único vestígio recuperado num local arqueológico (Kevin et al., 1987). Esta resistência é-lhe conferida pela sua estrutura característica, composta por duas matrizes diferentes, uma orgânica, constituída principalmente pela proteína colagénio que é o principal componente dos tecidos conectivos incluindo cartilagem, osso e dente, o colagénio consiste em três cadeias polipeptídicas enroladas entre si formando uma hélice tripla, ligadas por ligações covalentes, pontes de hidrogénio e “cross linkages” com a matriz inorgânica, composta principalmente por uma substância cristalina denominada por hidroxiapatite - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – e outros minerais, que representa cerca de 80% do peso do osso. Apesar da rigidez do material ósseo, este é metabolicamente activo, pois como qualquer tecido vivo, durante o período de formação e desenvolvimento, requerem constantemente nutrientes (Ballantine,1995). A quantidade de mineralização e sua distribuição nunca é constante, mesmo em indivíduos adultos, porque os iões de cálcio estão constantemente a trocar entre os cristais de hidroxiapatite e o plasma ou outros fluídos.

O esqueleto sofre contínuos processos de remodelamento, com destruição e formação de novo tecido ósseo, levado a cabo pelas células, osteoclastos e osteoblastos respectivamente (Fig. 2). Nos seres mais jovens onde os ossos são rapidamente remodelados, as concentrações de apatite podem variar muito.

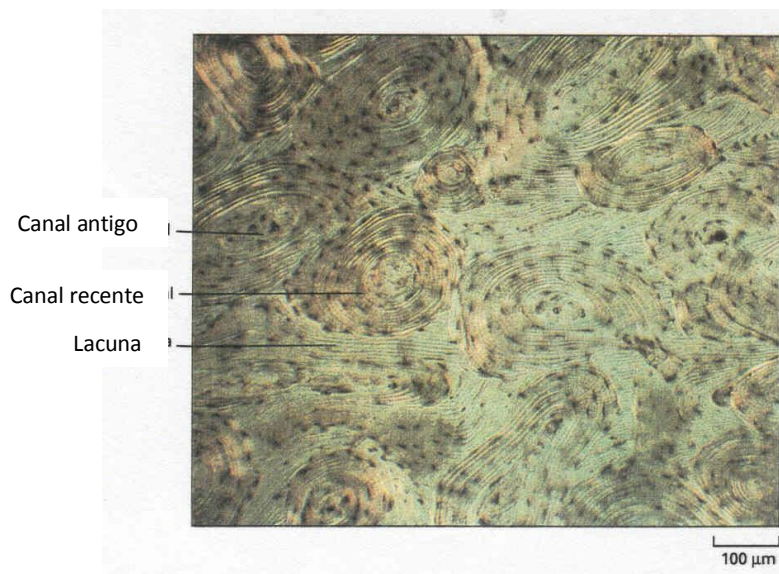


Figura 2- Secção transversal de uma porção de osso. A figura mostra os túneis formados pelos osteoclastos e depois preenchidos pelos osteoblastos durante as sucessivas remodelações do osso. Nesta secção apenas a matriz inorgânica foi preservada. Os anéis concêntricos (claros e escuros) correspondem a fibras de colagénio depositadas na matriz óssea. (Alberts, 1990)

Para este permanente remodelamento existe uma necessidade constante de minerais, e sendo a alimentação a principal via de entrada destes oligoelementos, a quantidade destes, no organismo, depende principalmente da sua concentração na dieta.

1.4.2- Dentes

Os dentes são estruturas que, a par da sua principal função de mastigação, podem actuar secundariamente na preparação de alimentos e de artefactos. As suas características excepcionais, permitem retirar um grande número de informações que os tornam extremamente valiosos para a arqueologia. De facto, sendo constituídos por tecidos altamente mineralizados (esmalte, dentina e cimento), muito pouco susceptíveis a alterações *ante mortem* e *post mortem* na sua composição química, tornam-se por vezes os únicos elementos arqueológicos a serem encontrados (Araújo, 1996).

Os dentes quanto à sua estrutura possuem três principais tecidos, o esmalte, camada exterior da coroa dentária, a dentina e o cimento situados na raiz. Estes componentes dentários são constituídos por uma densa matriz, composta principalmente pelo colagénio, mucopolisacarídeos e lípidos (Fig. 3). Para além disso, é constituído por 72% de elementos inorgânicos (minerais). Os dentes em semelhança com os ossos também não são propriamente um tecido “morto”, visto que a sua raiz possui uma cavidade, denominada de cavidade da pulpa, onde se encontram vasos sanguíneos e nervos.

Apesar de existirem bastantes semelhanças entre os ossos e dentes, estes últimos são mais estáveis, sendo portanto menos susceptíveis a alterações metabólicas e nutricionais, no entanto são incorporados elementos como o estrôncio (Ballantine, 1995; Boaz e Hampel, 1978).



Figura 3- Secção de um dente, mostrando as principais partes dos dentes e seus constituintes. A coroa, parte exposta, constituída pelo esmalte e dentina, a raiz constituída pela dentina e cimento. O dente é irrigado por vasos sanguíneos e nervos através do canal da raiz e cavidade da polpa.

1.5- MINERAIS E ELEMENTOS VESTÍGIAIS

Pelo menos 21 elementos minerais são essenciais para o desenvolvimento dos mamíferos, e desses, pelo menos metade são essenciais no desenvolvimento estrutural e funcional do tecido ósseo. Os requerimentos em minerais diferem consoante a idade, saúde e sexo de um indivíduo. À medida que o crescimento do osso ocorre, a necessidade de cálcio, fosfato e outros elementos vestigiais aumenta. A concentração destes minerais é muito influenciada por factores dietéticos (Ballantine, 1995).

Tem-se assumido na análise de elementos vestigiais aplicados à paleodieta que os níveis destes elementos no tecido ósseo, reflectem os níveis encontrados na dieta. Porém, a análise de elementos inorgânicos em material ósseo, está limitada pelo nosso ainda pequeno conhecimento dos processos pelos quais estes elementos, passam da dieta para os ossos e dentes. No entanto, através de alguns estudos nutricionais a

situação começou a ser clarificada, e descobertos alguns factores para além da concentração dos elementos químicos na dieta, que podem influenciar o nível destes elementos no osso, como a solubilidade, permeabilidade através da membrana intestinal, transporte no organismo e assimilação por parte do osso. De facto, a natureza complexa do processo de transferência dos oligoelementos da dieta para o tecido ósseo, torna incorrecta uma interpretação simples, baseada só nos níveis contidos na dieta (Lambert e Weydert-Homeyer, 1993).

Uma grande variedade de iões podem substituir os iões originais na matriz de hidroxiapatite. Alguns destes exemplos são o Sr^{2+} e Pb^{2+} por Ca^{2+} , F^- por OH^- , e CO_3^{2-} por PO_4^{3-} . Pode também acontecer outra possibilidade, em que os requerimentos de carga e espaço sejam menos restritivos, aí poderá acontecer troca heteroiónica entre Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ra^{2+} , Pb^{2+} , e Na^+ por Ca^{2+} e CO_3^{2-} , citrato, ésteres_fosfato e aminoácidos por fosfato (Marshall e Urist, 1980).

1.5.1- Cálcio (Ca)

O cálcio (Ca), um metal alcalino-terroso, é abundante na litosfera, existe como carbonato nos minerais aragonite e calcite e em rochas calcárias (Heslop e Jones, 1987). Nos alimentos as principais fontes de cálcio são o leite e produtos lácteos, seguidos por cereais, frutos e vegetais, embora estes últimos não sejam fontes particularmente importantes de cálcio (“www.ifr.bbsrc.ac.uk/foodinformation/minerals”).

Em condições metabólicas normais, os níveis de Ca no material ósseo permanecem relativamente constantes, independentemente da variação da dieta. Estes níveis de cálcio não apresentam qualquer correlação com os níveis encontrados na dieta, mas existe variabilidade baseada noutros factores dietéticos, nomeadamente o nível de

proteína e fibra consumida. O mais importante é a dieta rica em fibra, esta parece ligar-se irreversivelmente ao cálcio e outros elementos, tornando virtualmente impossível ao cálcio depositar-se nos tecidos ósseos. A relação entre a fibra na dieta e o cálcio ósseo é negativo, ou seja, dieta rica em fibra conduz a níveis mais baixos de cálcio nos ossos e dentes (Lambert e Weydert-Homeyer, 1993 e Ballantine, 1995).

1.5.2- Estrôncio (Sr)

O estrôncio (Sr) é um metal denominado alcalino terroso, existe na natureza sob a forma de estroncianite, SrCO_3 , como na celestite, SrSO_4 . O metal não tem importância económica, excepto na indústria de pirotecnia. O estrôncio-90 radioactivo tem uma vida longa e, sendo assimilado e incorporado no tecido ósseo com facilidade, é um produto da fissão do urânio bastante perigoso (Heslop e Jones;1987). O estrôncio no organismo humano ao contrário do cálcio não é controlado homeostaticamente. Este elemento é principalmente excretado pela urina, sendo o restante, praticamente todo armazenado na estrutura óssea (Kevin, 1987). O estrôncio é incorporado no osso pela troca com cálcio na matriz de hidroxiapatite. Quando existe muito cálcio disponível, a incorporação de Sr é mínima, só quando pouco Ca existe, este pode ser substituído por Sr, por isso a razão Sr/Ca é muito utilizada na reconstrução de dietas (Ballantine, 1995; Lambert e Weydert-Homeyer, 1993). O estrôncio é considerado como indicador do consumo vegetal, ou mais correctamente de fibra, pois os herbívoros apresentam normalmente concentrações mais elevadas no osso do que os carnívoros (Elias, 1980 e Safont *et al*, 1998).

1.5.3- Bário (Ba)

O bário, metal alcalino-terroso, existe com relativa abundância na litosfera, em filões de barite, $BaSO_4$, que é por vezes transformada em carbonato de bário, $BaCO_3$, pelos agentes atmosféricos, pelo contrário este elemento é relativamente pouco abundante na água do mar devido ao alto conteúdo de sulfatos, e à baixa solubilidade de $BaSO_4$ (Heslop e Jones; 1987).

No organismo humano, o bário é bastante semelhante ao estrôncio no mecanismo de incorporação óssea, mas para além do cálcio inibir o seu armazenamento nos ossos e dentes, também o estrôncio é preferencialmente incorporado na estrutura óssea em detrimento do bário (Ba). Este elemento tem sido utilizado como indicador do consumo vegetal pelas mesmas razões que o Sr, podendo ser mais sensível como indicador dietético (Safont *et al.*, 1998; Lambert e Weydert-Homeyer, 1993).

1.5.4- Zinco (Zn)

O zinco é um elemento que ocorre na natureza, principalmente como um sulfureto (0,02% da litosfera). Nos alimentos, a principal fonte de zinco é a carne (o conteúdo de zinco segue a côr da carne, ou seja, na carne vermelha existe maior quantidade do que na carne “branca” das aves), seguido de moluscos como as ostras, enquanto que os cereais possuem relativamente pouco zinco (cereais refinados não contêm praticamente nenhum zinco). Em dietas exclusivamente vegetarianas os cereais representam a principal fonte de zinco para o organismo (www.ifr.bbsrc.ac.uk/foodinformation/minerals.html e Gibson, 1994). O zinco é um elemento essencial para a boa mineralização do tecido ósseo, sendo importante em

acções enzimáticas. O zinco parece depositar-se no tecido ósseo quando os requerimento dos outros tecidos estiver atingido (Kevin, 1987 e Ballantine, 1995). Este elemento é conhecido por ser um excelente indicador do consumo de proteína (normalmente carne), pois dietas ricas em proteínas apresentam uma correlação positiva com o zinco encontrado no tecido ósseo (Lambert e Weydert-Homeyer, 1993). Existem no entanto outros factores que influenciam o armazenamento do zinco, tais como o **fitato** encontrados em sementes, pois estes inibem a absorção de zinco (Maga, 1982).

1.5.5- Cobre (Cu)

Comidas com alto teor em cobre são os cereais, nozes, moluscos, fígado e rins, contudo o conteúdo de cobre por parte dos alimentos é afectada pela sua origem geográfica (<http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/foodinformation/minerals.html>).

O cobre é um elemento essencial tal como o zinco, presente em algumas enzimas. A absorção de cobre tal como o zinco (Zn) pode ser inibido tanto pela presença de fitatos, como de fibra, isto tenderá a obscurecer o efeito do consumo de proteína (Maga, 1982).

Este elemento é um possível bom indicador do consumo proteico como parecem indicar alguns estudos anteriores (Safont *et al.*, 1998).

1.5.6- Manganês (Mn)

Este elemento (0,085% da litosfera) é o elemento de transição mais comum depois do ferro e titânio (Heslop e Jones; 1987). Relativamente altas concentrações de manganês (Mn) são encontradas nos cereais, apesar de estar muito dependente do pH do

Os tecidos animais contêm muito pouco Mn (www.ifr.bbsrc.ac.uk/foodinformation/minerals.html). Este elemento é importante para a formação do tecido ósseo e possivelmente nas funções neurais e reprodutivas. No entanto parece por estudos anteriores muito limitado na ajuda da reconstrução da dieta (Kevin *et al.*, 1987).

1.5.7- Sódio (Na)

O sódio (2,63% da litosfera) existe em grande abundância na crosta terrestre; as suas percentagens na água do mar é de 1,14% (Heslop e Jones; 1987). O sódio é um dos elementos mais importantes em processos fisiológicos nos vertebrados, e por isso é altamente regulado. Os níveis de sódio no dente e presumivelmente no osso, mostram pouca variabilidade dentro da mesma espécie, reflectindo diferentes adaptações fisiológicas nas diferentes espécies (Kevin *et al.*, 1987).

1.6- DIAGÉNESE

O estudo da paleodieta pela análise de elementos vestigiários, encontra sérios obstáculos, pois os resultados obtidos em alguns deste tipo de estudos, começaram a ser postos em causa, em virtude de se ter reconhecido que haviam factores que contribuía para uma análise errónea dos resultados. O principal destes obstáculos são as alterações químicas nos materiais ósseos após enterramento, denominadas de alterações diagenéticas (Sillen A., 1992 e João Cabral, 1996). O conceito de diagénese é aplicado a todas as mudanças químicas, físicas e biológicas em materiais geológicos e biológicos depois da sua deposição inicial (Bates e Jackson, 1987). O grau das alterações químicas

no tecido ósseo é influenciada pelo tamanho, forma, estrutura e densidade destes tecidos, mas também por factores externos, como, as águas subterrâneas, tipo de solo, temperatura e contacto com o ar. Os factores considerados mais significativos são a densidade do material e o tipo de solo onde ele se encontra (Buckberry, 2000). Durante a diagénese óssea, as concentrações de elementos vestigiários pode aumentar por uma ordem ou mais de magnitude, ou diminuir por um factor de três. Os elementos que normalmente mais se introduzem nos poros e nos cristais de apatite são o F, Si, Mn, Fe, FeO₃ e CaCO₃, enquanto a perda de elementos é usual em elementos como o Na, Cl e K (Byrne, 1987).

A diagénese pode ser interpretada como um simples fenómeno de dissolução/incorporação. Estudos experimentais, têm revelado que a incorporação de certos iões metálicos como o Ni²⁺ e Zn²⁺, inibem a dissolução, indicando que a diagénese não é só um processo de degradação mas pode também ser um elemento de protecção contra o ambiente (Quattropani *et al.*, 1997). O problema dos efeitos da diagénese no material ósseo e conseqüentemente no seu uso para análise da paleodieta, é de que estas alterações químicas caracterizam-se por uma redução na variabilidade entre diferentes amostras ósseas. Este fenómeno não só obscurece as diferenças entre diferentes espécies, como também na variabilidade natural dentro da mesma espécie (Sillen, 1992). Um grande número de diferentes técnicas tem sido usadas para diminuir os efeitos da diagénese, desde limpeza mecânica até lavagens do material ósseo (Sillen, 1992).

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- MATERIAL

Para a realização do estudo foi utilizado material corrente de laboratório, e amostras ósseas proveniente do sítio paleolítico da Lapa do Picareiro (Fig.4). Este local situa-se na Estremadura Portuguesa, mais precisamente na serra d’Aire, 10 km a sul da cidade de Fátima e a 40 km da costa oeste portuguesa. O material de estudo, foi composto por: 3 ossos de veado (*cervus elaphus*) com idades cerca de 10000, 12000 e 20000 anos, 1 osso de caprino com cerca de 100 anos, um dente de veado (*cervus elaphus*) com 10000 anos, 3 dentes humanos com idades de 4000 anos (LP.L13.1A, LP.I7 e LP.K13.1A.1) e um de 20000 anos (LP.D5.9B). Para além do material retirado da gruta foram utilizados 2 dentes humanos recentes (Fig.5). Para efectuar as várias análises, foram retiradas amostras entre 0.3 e 1g dos ossos e da raiz dos dentes.



Figura 4- (A) Mapa de Portugal, (B) Destaque da região de Fátima, e a zona da gruta da Lapa do Picareiro (www. Worldatlas.com e www.expedia.com).

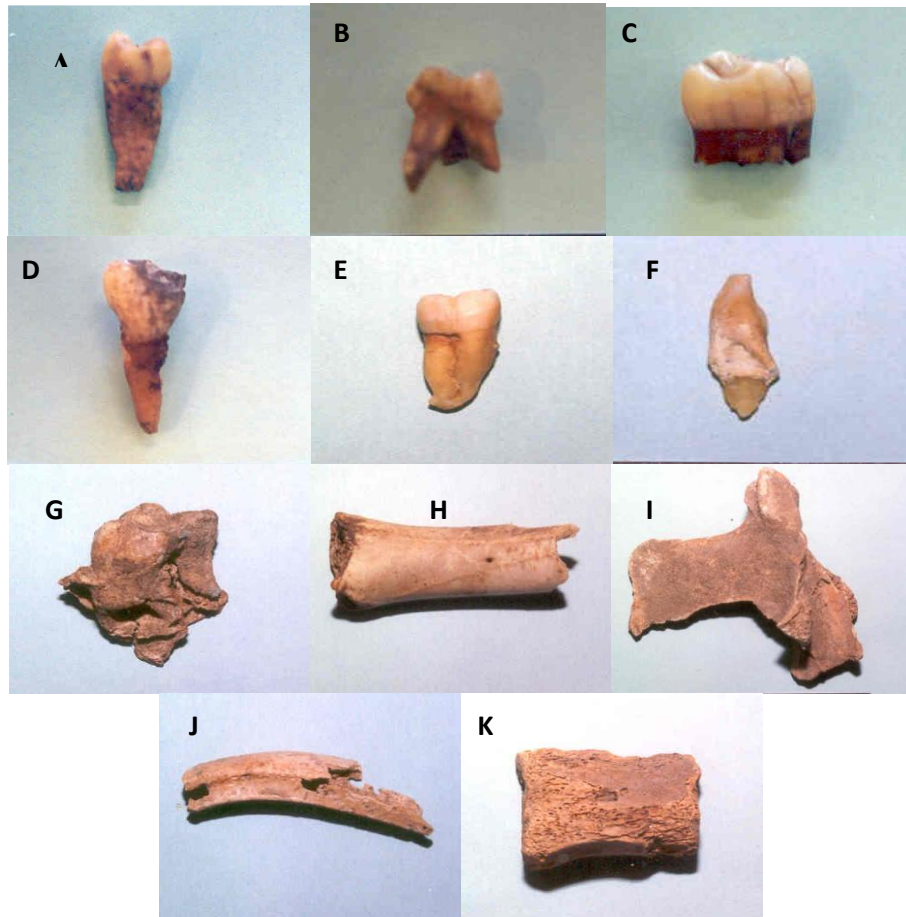


Figura 5- Amostras usadas no estudo da paleodieta: (A) Dente humano com 4000 anos-LP.L13.1A; (B) Dente humano com 20000 anos-LP.D5.9B (C) Dente humano com 4000 anos-LP.I7; (D) Dente humano com 4000 anos LP.K13.1A.1; (E) e (F) Dentes humanos recentes (G) Dente de veado com 10000 anos (H) Osso de caprino recente; (I) Osso de veado com 10000 anos (J) Osso de veado com 12000 anos; (K) Osso de veado com 20000 anos.

2.2- MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.2.1- Análise Elementar

A primeira fase do trabalho consistiu na observação do estado de conservação dos ossos e dentes, e medir o grau de contaminações exteriores, para tal, procedeu-se à análise da percentagem de carbono e azoto contidas nas amostras ósseas.

Foi utilizada a técnica de análise elementar, recorrendo para isso a um instrumento da Carlo Erba, Elemental Analyzer E. A.1108.

2.2.1.1- Elemental Analyzer – E.A. 1108

Nesta técnica para determina-se a percentagem total de carbono, hidrogénio, nitrogénio, enxofre e oxigénio (C,H,N,S,O) em relação ao peso da amostra. Podem ser analisadas amostras orgânicas e inorgânicas como: sedimentos e solos, cerâmicas, fibras de carbono, combustíveis, químicos orgânicos e muitos outros.

O princípio de funcionamento está representado no diagrama da figura 6. O método analítico é baseado na completa e instantânea oxidação da amostra por combustão.

As amostras, são colocadas numa cápsula de prata ou estanho, dentro do tambor “autosampler”, onde são purgadas com um fluxo constante do gás hélio, e então largadas em intervalos predefinidos num tubo de quartzo mantido a 1020° C (reactor de combustão), constituído por óxido de cromo e óxido de cobalto separados por malha de quartzo. Os produtos de combustão, passam por uma fornalha de redução, nesta altura, o gás hélio é enriquecido com oxigénio puro, de modo que as amostras e a cápsula derretem, o que promove uma reacção violenta. Nestas condições até materiais resistentes a altas temperaturas são completamente oxidadas e convertidos em gases.

A mistura resultante é direccionada para uma coluna cromatográfica (porapak PQS) onde os componentes individuais são separados e eluidos como nitrogénio (N₂), dióxido de carbono (CO₂), água e dióxido de enxofre (SO₂). Estes elementos são então analisados pelo detector (condutibilidade térmica) que transmite um sinal proporcional à concentração individual dos componentes na mistura (Manual do Elemental Analyzer AA 1108).

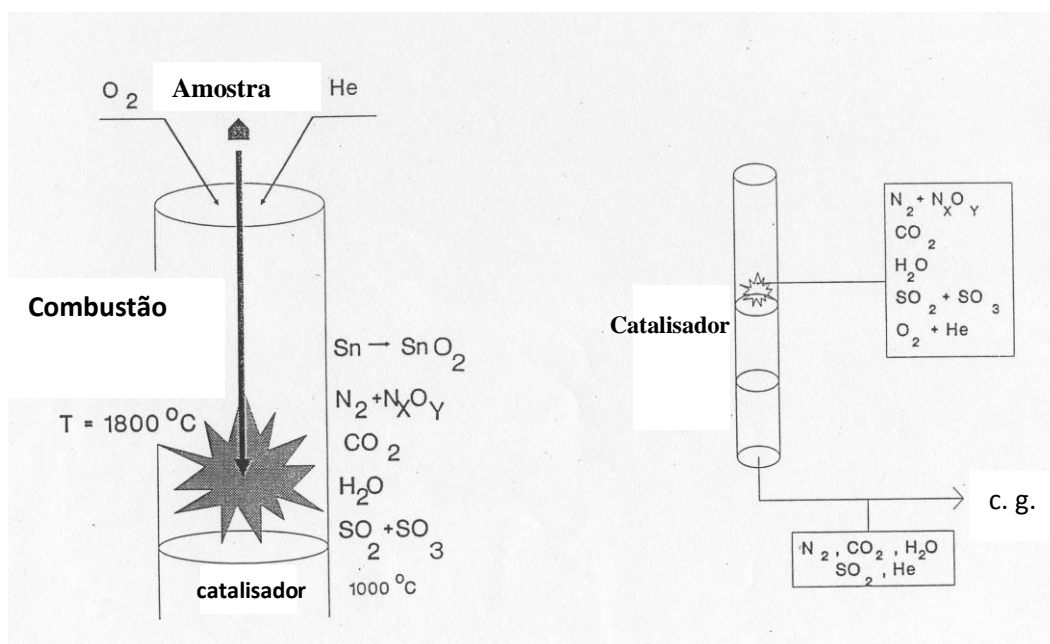


Figura 6- (A) Pormenor da combustão da amostra no reactor de combustão, (B) Visão geral da combustão da amostra, e redução dos produtos resultantes em N_2 , CO_2 , H_2O , SO_2 e He seguida da sua separação por cromatografia gasosa (Manual do Elemental Analyzer AA 1108).

2.2.1.2-Preparação das amostras biológicas

O primeiro passo foi efectuar uma limpeza mecânica aos ossos e dentes com a ajuda de um bisturi e uma pequena escova, para eliminar o máximo de contaminações externas, e colocados numa estufa a $80^\circ C$ durante a noite, para retirar possível humidade.

Após este tratamento, retiraram-se pequenas amostras do material ósseo (entre 0,3g e 1g conforme o material disponível), que no caso dos dentes, foram retiradas da zona da raiz e reduzidas a pó de modo bem homogéneo (um dos principais parâmetros é o grau de homogeneização do material a ser analisado por este método). Entretanto, procedeu-se à limpeza das cápsulas (uma para cada amostra) para posterior colocação das

amostras, com acetona e em seguida com água destilada, sendo colocadas numa estufa a 110°C, até as cápsulas estarem completamente secas.

O encapsulamento das amostras (Fig.7) foram levadas a cabo com a ajuda do material adequado, tendo em atenção alguns aspectos fundamentais no manuseamento e empacotamento. Para além das amostras ósseas foram encapsuladas amostras padrão de sulfanilamida ($C_6H_8O_2SN_2$) e preparado um branco, constituído apenas pela cápsula. Por fim efectuou-se a análise das amostras em conjunto com o branco e os padrões de sulfanilamida de 1 e 2 mg/ml.

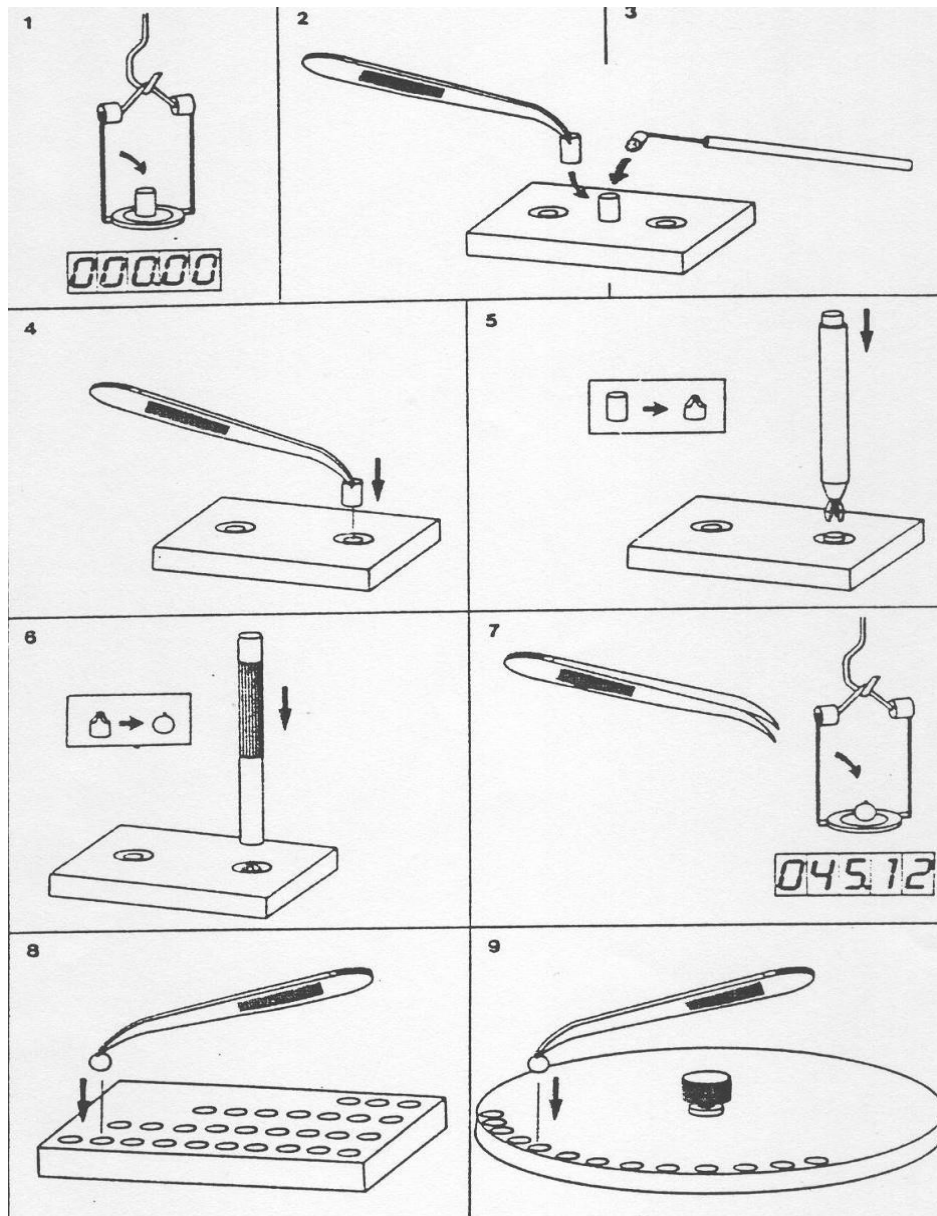


Figura 7- Esquema da preparação das amostras para análise elementar. (1) Fazer o desconto do peso da cápsula na balança, (2) com a ajuda de uma pinça colocar a cápsula num suporte, (3) colocar a amostra dentro da cápsula, (4, 5 e 6) fechar a cápsula tendo o cuidado de ao condicionar bem a amostra, não deixar nenhum ar, (7) pesar a amostra, (8 e 9) colocar as amostras encapsuladas pela ordem de análise no “autosampler” (Manual do Elemental Analyzer AA 1108).

2.2.2-Espectroscopia de Absorção Atómica

Para efectuar o estudo da dieta propriamente dita, efectuou-se uma análise quantitativa de alguns dos elementos vestígias (Ba, Zn, Cu, Mn e Na) presentes no material ósseo. Estes elementos foram escolhidos pela sua reconhecida capacidade de serem indicadores da paleodieta (Kevin e Parris, 1987). Nesta análise foi utilizado um espectrofotómetro de absorção atómica Varian AA-20 equipado com chama e câmara de grafite.

2.2.2.1- Espectrofotómetro Varian AA-20

Nos equipamentos de absorção atómica podemos distinguir os seguintes sistemas instrumentais:

- 1.** Sistema de emissão, que consiste numa fonte de radiação que emite o espectro do elemento a analisar; a radiação emitida é dirigida para o meio absorvente formado pelos átomos da amostra.
- 2.** Sistema de absorção, constituído por vapor atómico que vai absorver parte da energia emitida pela fonte.
- 3.** Sistema de selecção, consiste no equipamento para selecção espectral. O sistema inclui a parte óptica, filtros monocromadores e acessórios mecânicos.
- 4.** Sistema de detecção ou registo, que consiste em sistemas para fotodeteção e de medida

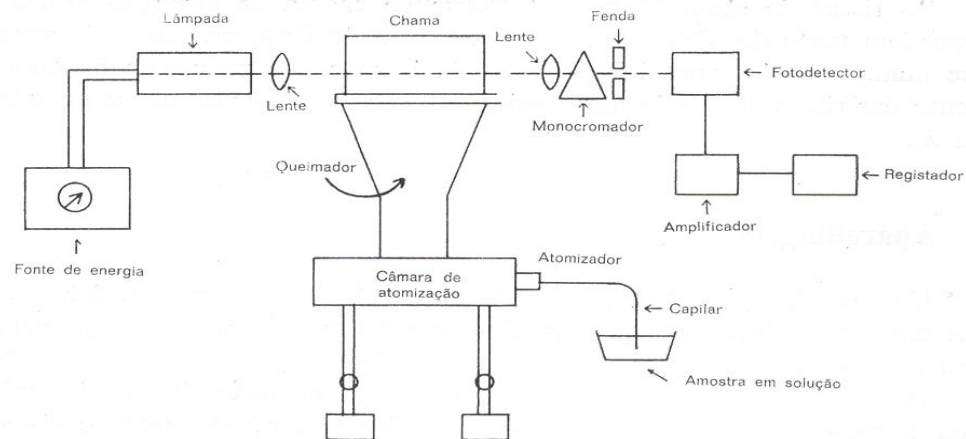


Figura 8- Esquema de um espectrofotômetro de absorção atômica (Gonçalves, 1983)

Na absorção atômica de chama, a solução contendo a amostra deve ser introduzida com uma velocidade contínua e estável, esta é atomizada por uma chama de oxigênio e acetileno, formando um meio absorvente. Sobre essa chama faz-se incidir radiação de intensidade definida e comprimento de onda específico, produzida pela descarga luminosa de uma lâmpada de cátodo oco do elemento a analisar.

O feixe de radiação ao passar através da chama que contém o meio absorvente (este meio actua como se fosse a célula absorvente, de espessura definida, em espectrofotometria do visível e ultravioleta) vai ser absorvido e detectado pelo fotodetector. Como a intensidade da luz detectada é menor do que a emitida pode-se quantificar o elemento a analisar através de cálculos com base na lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon l C$$

em que ϵ é definido como o coeficiente de absorção específico, l é a espessura do meio, neste caso a chama, e C é a concentração de átomos na chama, ou seja a sua pressão parcial.

No caso de absorção atômica em câmara de grafite, apenas um pequeno volume da amostra é injectado, dando-se a sua atomização à custa de uma corrente eléctrica entre dois eléctrodos ligados aos extremos da câmara.

Quando se introduz uma amostra líquida ou sólida, numa câmara de grafite, sobe-se primeiro a temperatura de modo a remover, tanto quanto possível, as substâncias presentes antes que o elemento em estudo seja dissociado térmicamente em átomos. A sensibilidade da absorção atômica com câmara de grafite é na ordem dos ppb ($\mu\text{g/L}$) enquanto na chama é na ordem dos ppm (mg/L) (Gonçalves, 1983).

2.2.2.2- Preparação das amostras

Para a preparação das amostras todo o material de laboratório a ser utilizado foi lavado com ácido nítrico 20% e posteriormente lavado com água desionizada.

Para quantificação de elementos vestigiais, retiraram-se amostras entre 0,3 e 0,1g do material ósseo. Colocaram-se as amostras na estufa a 80°C durante a noite para retirar possíveis humidades. Seguidamente, submeteram-se as amostras a uma lavagem rápida com ácido nítrico (HNO_3) a 20% para retirar possíveis contaminações superficiais, voltando-se a secar as amostras novamente. Após secagem as amostras foram pesadas e digeridas com 1mL de HNO_3/HCl 3:1. O ácido clorídrico, foi usado para uma melhor digestão, apesar de poder causar algumas interferências, na análise de alguns elementos (Outridge *et al*, 1996). Em alguns casos a sua completa digestão foi difícil de conseguir pela rigidez do material ósseo, pelo que se teve de dar um ligeiro aquecimento à solução.

Procedeu-se então a uma diluição suficiente das soluções originais (100X e 1000X) de modo a detectar os elementos por chama ou câmara de grafite. Essas diluições foram efectuadas num balão de 25 mL com água desionizada, e foram então determinadas as concentrações dos elementos vestígias por absorção atómica com chama e câmara de grafite (Tab.I).

Tabela I- Condições operatórias do AA com chama

| Espectrómetro Varian Spect AA 20 | |
|---|--------------|
| Modo de Instrumento | absorvância |
| Modo de Calibração | concentração |
| Modo de Medida | integração |
| Posição da Lâmpada | 1 |
| Corrente (mA) | 4 |
| Largura da Fenda (nm) | 0,5 |
| Comprimento de onda (nm) | * |
| Chama | ar-acetileno |
| Introdução da Amostra | manual |
| Tempo de Medida (seg) | 1 |
| Correcção de deutério | presente |

2.2.3- Cromatografia de Troca Iónica

Para análise da concentração de cálcio e estrôncio, foi usada a cromatografia de troca iónica, utilizando um cromatógrafo Shimadzu com uma coluna Chrompack Ionospher C (para catiões divalentes).

2.2.3.1- Cromatógrafo Shimadzu

Os métodos cromatográficos são usualmente aplicados em métodos de separação e quantificação. Em todos os tipos de cromatografia, uma amostra é fraccionada num líquido ou num gás, denominado de fase móvel. A mistura resultante é transportada através de uma coluna constituída por uma matriz sólida e porosa (fase estacionária). As interacções dos diversos componentes da amostra com a fase estacionária, actuam, retardando o seu progresso, dependendo das propriedades de cada componente (Voet e Voet, 1995).

Na cromatografia de troca iónica, os componentes (iões) da amostra interagem com a fase estacionária pelas suas propriedades iónicas. À medida que a coluna é lavada, num processo denominado de eluição, os iões com menor afinidade pela fase estacionária (trocador iónico), movem-se através da coluna mais rapidamente do que aqueles que interagem com mais afinidade. Os diferentes iões na amostra, são então eluidos e separados em tempos distintos (Smith, 1988).

2.2.3.2- Procedimento

Para quantificar o Ca^{2+} e o Sr^{2+} , foram utilizadas as soluções originais (não diluídas) com as amostras já digeridas, utilizadas para quantificação por espectroscopia de absorção atómica.

Estas amostras foram filtradas, com um filtro de 50 μl , para retirar pequenas impurezas, suficientes para afectar a coluna de troca catiónica. Posteriormente estas mesmas amostras foram diluídas 10000 X, com água desionizada.

Entretanto, efectuou-se a preparação do eluente (fase móvel) para uma preparação inicial da coluna e posterior utilização na eluição das amostras.

Para um bom empacotamento e estabilização da coluna, correu-se o eluente na coluna durante o tempo suficiente até dar uma boa linha de base (coluna estabilizada).

Prepararam-se os padrões CaCl_2 e SrCl_2 com água desionizada, com as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75 ppm, e aplicados 20 μl de cada no cromatógrafo.

Posteriormente foram então aplicados 20 μl de cada amostra a analisar (Tab.II).

Tabela II- Características e condições operatórias da coluna Chrompack para catiões divalentes utilizada na cromatografia de troca iónica.

| Coluna Chrompack | |
|-------------------------|-----------------------|
| Comprimento | 100 mm |
| Diâmetro Interno | 3 mm |
| Diâmetro Externo | 9 mm |
| Material | Vidro |
| Resina | Ionospher C |
| Partículas da resina | 5 μm |
| Pressão Máxima | 20 MPa |
| Eluente | 10 mM ácido cítrico |
| | 10 mM ácido tartárico |
| | 6 mM etilenodiamina |

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Analise Elementar

Esta analise elementar foi efectuada para tentar elucidar e avaliar o grau de preservação e contaminação do material ósseo. A analise da percentagem de carbono (C) e azoto (N), contido no material ósseo (ossos e dentes), revelou alguns dados interessantes (Tab. III), que podem ser melhor observados nas figuras 9 e 10.

Tabela III – Percentagens de carbono e nitrogénio presentes nas amostras de tecido ósseo, analisadas por Analise Elementar.

| Amostras | Replicados | Peso total (mg) | % de carbono | % de Nitrogénio |
|-----------------|-------------------|------------------------|---------------------|------------------------|
| Osso veado | 1 | 1,053 | 7,893 | 0,937 |
| 10000 anos | 2 | 2,363 | 8,237 | 0,774 |
| Osso veado | 1 | 1,053 | 4,454 | 0,290 |
| 12000 anos | 2 | 2,422 | 4,733 | 0,287 |
| Osso de cabra | 1 | 1,241 | 12,076 | 3,889 |
| Recente | 2 | 2,621 | 11,804 | 3,810 |
| Osso de veado | 1 | 1,238 | 4,568 | 0,341 |
| 20000 anos | 2 | 2,744 | 4,336 | 0,282 |
| Dente molar | 1 | 1,088 | 1,395 | 0,106 |
| humano recente | 2 | 2,583 | 1,119 | 0,094 |
| Dente veado | 1 | 1,022 | 3,696 | 0,596 |
| 10000 anos | 2 | 2,041 | 3,750 | 0,559 |

No caso das amostras de ossos, os resultados mostraram que quanto maior era a idade das amostras, menor a sua percentagem em carbono e nitrogénio (Fig.9). A percentagem de nitrogénio apresentou-se sempre menor que a de carbono, embora a relação C/N tenha diferido consideravelmente entre as amostras, apresentou o padrão

inverso em relação à percentagem destes mesmos elementos, ou seja, quanto maior a idade das amostras, maior a relação C/N.

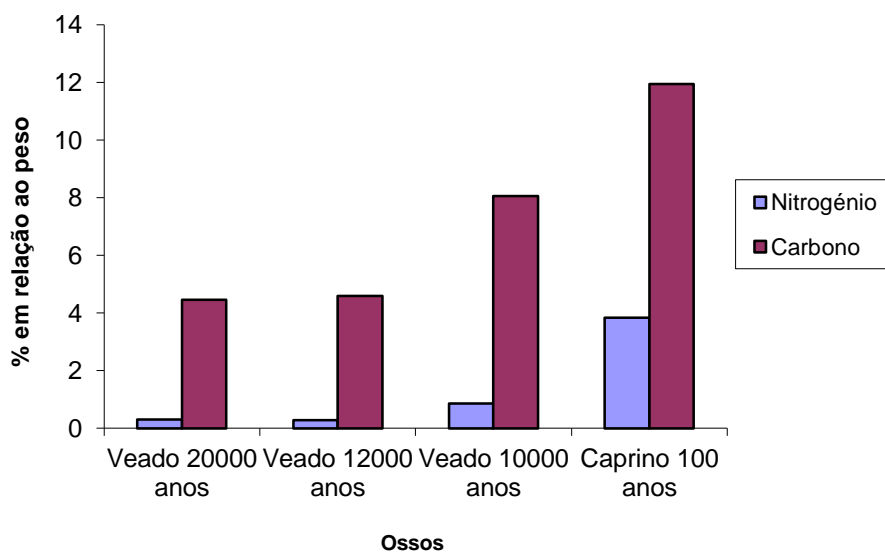


Figura 9- Valores médios da percentagem de carbono e nitrogênio presentes nas amostras de ossos antigos de veado e de caprino, (n=1, 2 replicados).

Nos ossos, o carbono encontra-se principalmente na forma de colagénio (principal constituinte da parte orgânica), representando 10-15% do peso total do osso, este elemento pode também ser encontrado na parte inorgânica, embora em pequenas quantidades (Sullivan e Krueger, 1981).

Estes dados mostram que no caso destas amostras de ossos, exceptuando o do caprino, existe uma gradual e acentuada deterioração da parte orgânica do osso em relação à idade. Esta deterioração era previsível na medida em que, a parte orgânica do material ósseo é a primeira a degradar-se *post mortem*. A proporção entre o carbono e

nitrogénio nos ossos de veado, os mais antigos, situa-se entre 16:1 e 9:1 C/N, enquanto no osso de caprino, o mais recente, é de 3:1 C/N. Este resultado parece demonstrar que houve uma contaminação de carbono nas amostras, vindo do meio exterior aquando da deposição deste material no solo da gruta. Estas contaminações foram também levadas em consideração quando foram efectuadas as análises aos elementos vestigiais.

Os resultados para as amostras de dentes foram totalmente diferentes (Fig.10), visto que ao contrário dos ossos, o dente de veado com 10000 anos, apresentava um valor mais elevado de carbono que o dente humano de idade recente, e a proporção entre o carbono e o nitrogénio é cerca do dobro no dente de veado em relação ao dente humano.

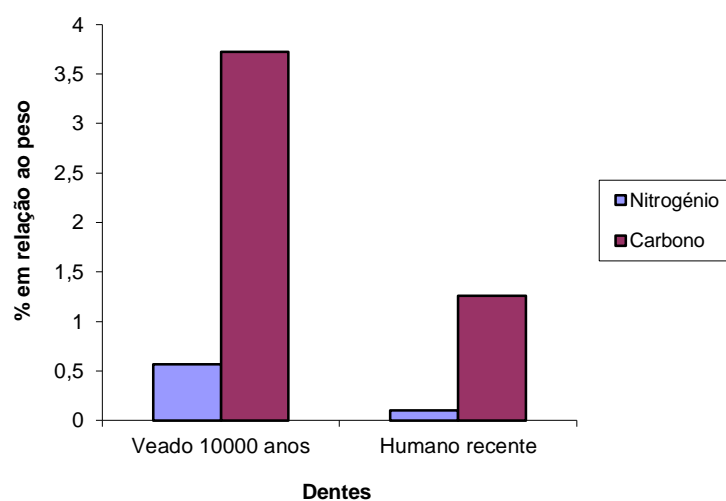


Figura 10- Valores médios da percentagem de carbono e nitrogénio presentes nas amostras de dentes de veado e humano (n=1, 2 replicados).

Estes resultados foram inesperados, pois esperava-se que os dentes mais antigos devido à deterioração possuíssem menos carbono que os dentes de idade recente, e por

outro lado, esperava-se que a proporção entre o carbono e o nitrogénio fosse menor no dente de veado do que no dente humano devido a possíveis contaminações externas de carbono. Os dados parecem indicar que ocorreu contaminação de carbono e/ou nitrogénio pelo meio ambiente, no entanto a diferença encontrada pode dever-se à comparação entre dentes de espécies muito diferentes, ou um pouco das duas hipóteses.

Os diferentes valores de C e N encontrados entre os ossos e os dentes, devem-se sobretudo a diferenças na composição, o que os pode tornar mais ou menos susceptíveis a contaminações do meio ambiente.

3.2- Espectroscopia de absorção atómica

Na análise de elementos vestigiais por espectroscopia de absorção atómica foram quantificados, o Zn, Cu, Ba, Na e Mn, sendo as concentrações destes elementos (Tab. IV), no material ósseo apresentadas em ppm (partes por milhão).

Tabela IV- Concentração em mg/L (ppm) dos elementos presentes nas amostras analisadas por A.A.

| Amostra | [Zn] | [Cu] | [Ba] | [Na] | [Mn] |
|-------------------------------|-------|---------|------|------|------|
| Osso de veado 10000 anos | 76,9 | 7,2 | 37,1 | 3445 | 88,2 |
| Osso de veado 12000 anos | 140 | 4,8 | 36,3 | 4067 | 42,4 |
| Osso de cabra recente | 117,9 | 2,1 | 93,1 | 3268 | 20,2 |
| Osso de veado 20000 anos | 108,4 | 2,7 | 29,5 | 3855 | 18,6 |
| Dente molar humano recente | 232 | 1,4 | 13,8 | 5000 | 4,7 |
| Dente veado 10000 anos | 143,9 | 2,1 | 37,6 | 4112 | 26,5 |
| Dente incisivo humano recente | 200,3 | ---- ** | 20,8 | 5490 | 3,9 |
| Dente LP.I7 (4000 anos) | 186,1 | 3,3 | 19,5 | 3215 | 37,3 |
| Dente LP.K13.1A.1 (4000 anos) | 115 | 5,3 | 26,8 | 3014 | 11,3 |
| Dente LP.D5.9B (20000 anos) | 213 | 2,4 | 17,8 | 3166 | 60,4 |
| Dente LP.L13.1A (4000 anos) | 154,3 | 2,5 | 38,1 | 3358 | 93,5 |

(**) – Não foi detectado cobre para o dente incisivo humano recente

3.2.1- Zinco

Os resultados obtidos para o zinco (Fig.11), revelam que este elemento existe em menor quantidade no dente de veado do que no dente humano moderno. Este, apresenta níveis semelhantes ao encontrado no dente humano com 20000 anos, enquanto que nos dentes humanos com 4000 anos foram detectados valores inferiores.

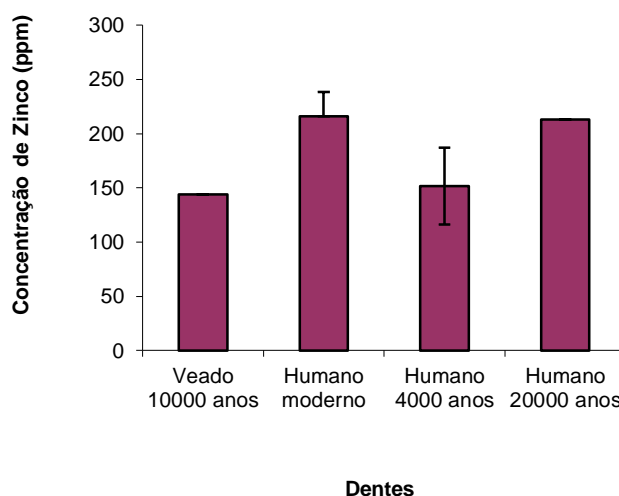


Figura 11- Concentração de Zn em ppm e seu desvio padrão, presente nas amostras de dentes humanos e veado de diferentes idades (n=1-3), analisados por espectroscopia de absorção atômica com chama.

O zinco existente nos ossos há muito que é conhecido por ser um bom discriminador em relação ao consumo de proteínas. Assim, o valor obtido para o dente de veado é o mais baixo entre as amostras de dentes como seria de esperar, pois este é um animal herbívoro, logo com uma dieta muito pobre em proteínas.

Nos dentes humanos, surgiram dois grupos dietéticos distintos, isto é, o humano com 4000 anos com um nível de Zn muito semelhante ao do veado, sugerindo uma dieta baixa no nível de proteínas, o outro, composto pelos dentes humanos recentes e os de 20000 anos, com níveis de zinco mais elevados, revelando por isso um maior consumo proteico.

3.2.2- Bário

O bário, considerado um bom discriminador do consumo de alimentos ricos em fibra, apresentou valores mais elevados no dente de veado do que nos dentes humanos (Fig.12). Dentro do grupo dos dentes humanos, os recentes e os com 20000 anos apresentam os valores mais baixos para este elemento.

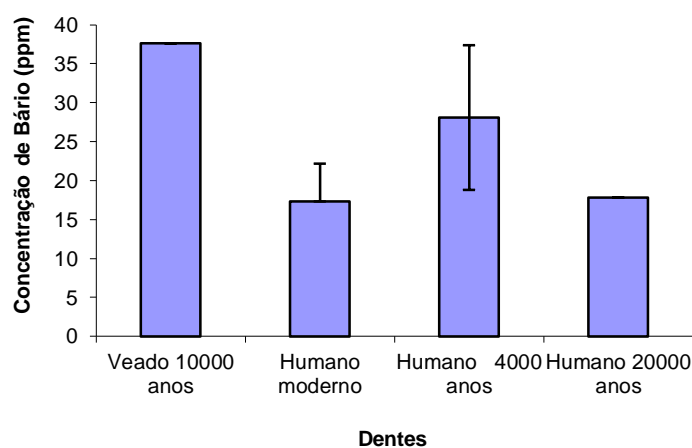


Figura 12- Concentração de Ba em ppm e seu desvio padrão, presente nas amostras de dentes humanos e veado de diferentes idades (n=1-3), analisados por espectroscopia de absorção atômica com chama.

O resultado apresentado pelo dente de veado é consistente com o pressuposto de que os herbívoros possuem valores mais elevados de Ba em relação aos carnívoros e omnívoros. Os valores deste elemento nos dentes humanos, sugerem que os humanos com 4000 anos possuíam uma dieta à base de alimentos com níveis elevados de fibra em relação aos homens modernos e de 20000 anos.

3.2.3- Cobre

O cobre é outro elemento que à semelhança do zinco, é considerado um bom indicador do consumo proteico. Os resultados obtidos (Fig.13) revelam que os dentes humanos com 4000 anos apresentam os valores mais elevados de cobre, enquanto os restantes apresentam menores quantidades deste elemento.

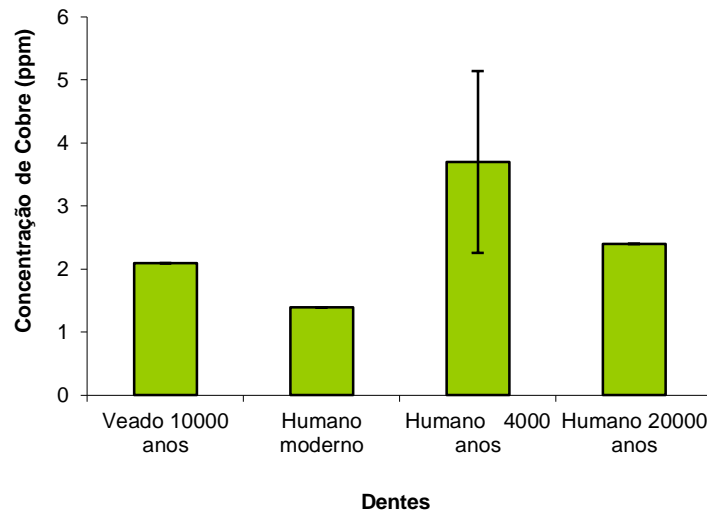


Figura 13- Concentração de Cu em ppm e seu desvio padrão, presente nas amostras de dentes humanos e veado de diferentes idades (n=1-3), analisados por espectroscopia de absorção atômica com chama.

Estes resultados não estão de acordo com o que se esperava após os resultados obtidos para o Zn. Pelo contrário, os valores apontam para um consumo proteico inverso, ou seja, os humanos com 4000 anos com um consumo relativamente mais elevado de proteínas em comparação aos humanos modernos e com 20000 anos.

Estudos recentes apontam para um valor mais elevado de cobre em dietas humanas vegetarianas do que em omnívoras, pois este elemento é muito abundante em cereais não refinados, legumes, nozes e alguns vegetais (Gibson, 1994). Isto parece indicar ao contrário do pressuposto, de que o cobre não é um bom indicador do consumo proteico (carne) nos humanos.

3.2.4- Sódio

Em relação ao sódio (Na), os dentes humanos modernos apresentaram os valores mais elevados, seguidos pelo dente de veado (Fig.14). Nos dentes humanos antigos as concentrações de Na obtidas foram as mais baixas.

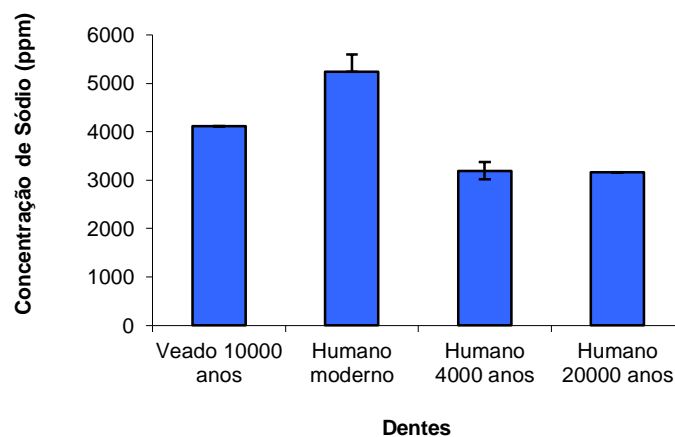


Figura 14- Concentração de Na em ppm e seu desvio padrão, presente nas amostras de dentes humanos e veado de diferentes idades (n=1-3), analisados por espectroscopia de absorção atômica com chama.

Os resultados de sódio obtidos para o dente de veado e dentes humanos modernos parecem consistentes com uma maior concentração deste elemento nos omnívoros do que nos herbívoros (Kevin e Parris, 1987).

Pelo contrário, os baixos valores de sódio nos dentes humanos antigos em relação aos do moderno, contrariam o facto de este elemento exibir normalmente níveis semelhantes dentro da mesma espécie. Esta diferença parece indicar um nível elevado de diagénese nos dentes humanos antigos, embora este factor tenha afectado de maneira semelhante os dentes com 4000 e 20000 anos, pois estes apresentam valores de sódio muito semelhantes.

A análise da concentração de sódio no material ósseo parece não ser relevante para diferenciar o tipo de dieta, apesar disso denota ser importante no estudo das paleodietas, pois parece ser um bom indicador da existência de contaminações sofridas pelo material ósseo.

3.2.5- Manganês

Os resultados obtidos para este elemento não revelaram nenhum padrão entre os diversos grupos de amostras (Fig.15), apresentando um alto grau de variabilidade.

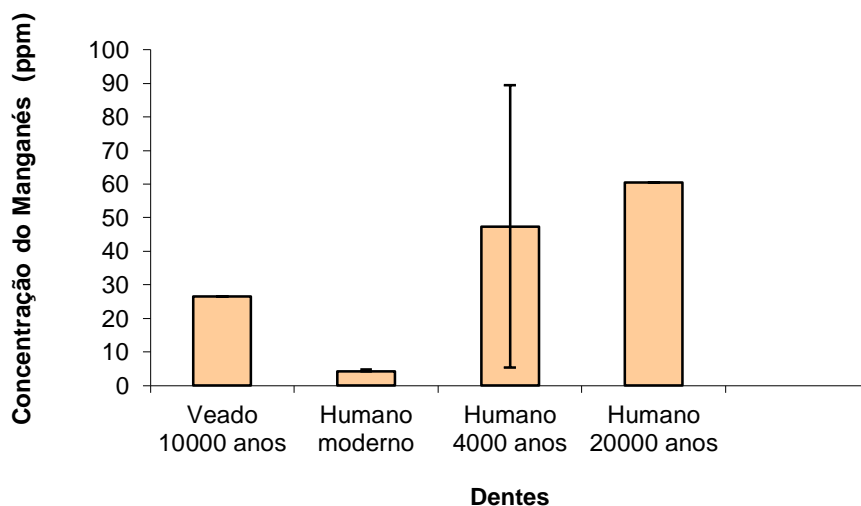


Figura 15- Concentração de Mn em ppm e seu desvio padrão, presente nas amostras de dentes humanos e veado de diferentes idades (n=1-3), analisados por espectroscopia de absorção atômica com chama.

A alto nível de variabilidade nos valores obtidos para o manganês parecem indicar que este elemento sofreu um elevado grau de diagênese nas amostra antigas. Estes vão ao encontro dos resultados obtidos em outros estudos, em que colocam o Mn na lista de elementos pouco recomendados no estudo da paleodieta, por ser altamente afectado pela diagênese relativamente ao tipo de solo em que o material ósseo se encontrava depositado (Kevin e Parris, 1987).

3.3- Cromatografia de troca iónica

Na análise de cálcio e estrôncio, obtiveram-se dificuldades na análise deste último elemento pois a concentração de cálcio nas amostras era enorme relativamente à concentração do estrôncio, o que mascarou o sinal deste elemento.

3.3.1-Cálcio

A concentração relativa de Ca no material ósseo têm sido normalmente usada no estudo da paleodieta para determinar a extensão de deterioração da parte inorgânica do material ósseo, pois o nível de Ca neste tipo de material permanece relativamente constante, irrespectivamente da sua variação na dieta. No presente estudo foram obtidos as concentrações de cálcio (Tab.V) nas diferentes amostras e calculadas as suas percentagens em cálcio.

Tabela V – Concentração e percentagem de cálcio presente nas amostras analisadas por cromatografia de troca iónica

| Amostra | [Ca ²⁺] (g/mL) | % de Cálcio |
|-------------------------------|----------------------------|-------------|
| Osso de veado 10000 anos | 221 | 22,1 |
| Osso de veado 12000 anos | 217 | 21,7 |
| Osso de cabra recente | 402 | 40,2 |
| Osso de veado 20000 anos | 395 | 39,5 |
| Dente molar humano recente | 305 | 30,5 |
| Dente veado 10000 anos | 410 | 41 |
| Dente incisivo humano recente | 356 | 35,6 |
| Dente LP.I7 (4000 anos) | 180 | 18 |
| Dente LP.K13.1A.1 (4000 anos) | 300 | 30 |
| Dente LP.D5.9B (20000 anos) | 290 | 29 |
| Dente LP.L13.1A (4000 anos) | 195 | 19,5 |

Os resultados obtidos para o Ca (Fig.16) foram menores nos dentes humanos antigos sugerindo uma pequena deterioração da parte inorgânica, em relação aos do homem moderno.

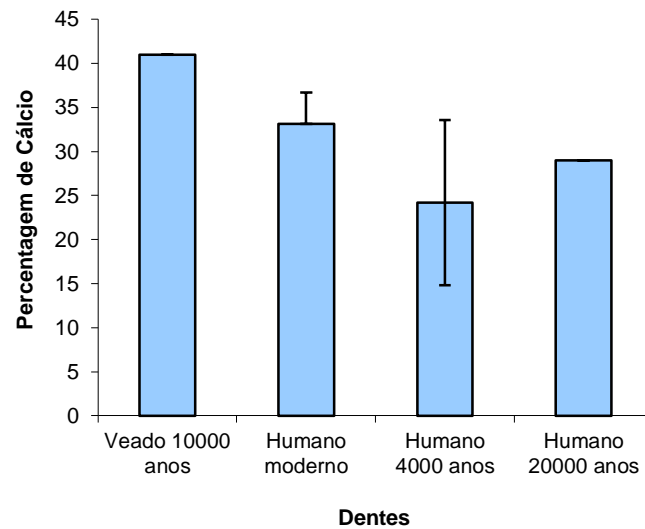


Figura 16- Percentagem de Ca^{2+} e seu desvio padrão, presente nas amostras de dentes humanos e veado de diferentes idades ($n=1-3$), analisados por cromatografia de troca iônica.

Os valores de Ca foram também utilizados para verificar a razão $[\text{Ba}]/[\text{Ca}]$ (Fig.17), pois como a incorporação de Ba no tecido ósseo é inibida pela quantidade de Ca existente, e este é inibido pela quantidade de fibra consumida, logo uma correlação existe entre estes dois elementos. Os valores de Ba só por si podem revelar uma ideia distorcida do consumo de fibra.

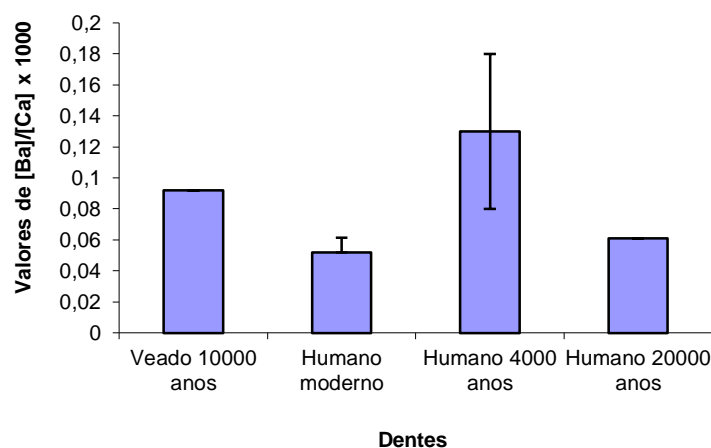


Figura 17 - Valores de [Ba]/[Ca] x 1000, e seu desvio padrão, presente nas amostras de dentes humanos e veado de diferentes idades (n=1-3).

Assim, os valores da razão [Ba]/[Ca], demonstram que o nível de fibra consumida pelo veado não foi tão elevada como os valores só de Ba faziam crer. Em relação às amostras de dentes humanos, continua a verificar-se a existência de dois grupos dietéticos distintos, em que os humanos com 4000 anos apresentam valores que sugerem um maior consumo de fibras em relação aos humanos modernos e com 20000 anos.

3.4- Grupos dietéticos do homem do sítio Paleolítico da Lapa do Picareiro

Após a uma análise conjunta de todos os resultados das diferentes técnicas utilizadas, verifica-se a existência de dois grupos dietéticos distintos no sítio Paleolítico da Lapa do Picareiro, um constituído pelo homem com 4000 anos e o outro pelo homem de há 20000 anos.

Os valores de Zn e [Ba]/[Ca] demonstram que o homem com 4000 anos recorria principalmente a uma dieta rica em fibra ao contrário do homem de 20000 anos com uma dieta essencialmente proteica. Isto não quer dizer que estes humanos não fossem na sua essência seres omnívoros, apenas revela a base principal da sua dieta.

Os resultados de cobre são um pouco mais difíceis de interpretar, pois parecem contradizer os resultados obtidos pelo Zn, no entanto este elemento quando comparado com os valores de Zn, sugere ser um bom indicador do nível omnívoro de uma população. Se o Zn for consumido sob a forma de produtos vegetais, muito pouco deste Zn irá ser assimilado, logo o principal fornecimento deste elemento irá ser os derivados de carne e peixe, pelo contrário o Cu pode ser assimilado a partir de variados alimentos como vegetais, cereais e carne (Gibson, 1994). Se levarmos em conta esta informação e observarmos os resultados obtidos pode-se concluir que o homem com 4000 anos levaria uma dieta mais omnívora que os de 20000 anos, que aparentemente teriam uma subsistência mais especializada em produtos de caça (carne e/ou peixe).

Em relação aos valores de Mn obtidos, nada se pode concluir devido ao alto grau de diagénese sofrido por este elemento nas amostras estudadas.

O Na apesar de não nos dar qualquer tipo de informação em relação ao tipo de dieta levada pelos humanos antigos, provou ser um bom indicador da diagénese sofrida por este elemento.

4- CONCLUSÕES GERAIS

Em conclusão, quando os resultados apresentados aqui são analisados em conjunto, parece claro que existem dois grupos dietéticos dos humanos com 20000 e 4000 anos, um com consumo mais elevado em proteína e o outro com uma importante dieta em fibra. A contribuição do consumo de peixe e outros animais marinhos, para os valores proteicos obtidos nos dois grupos, não foi exactamente conseguida, apesar de parecer indicar que o grupo com 4000 anos apresentava uma dieta mais rica neste tipo de alimentos, não querendo dizer com isto que o grupo com 20000 anos não utilizasse também este tipo de alimentos na sua dieta. É bom referir que com este estudo apenas consigo fazer uma comparação da dieta entre estes dois grupos humanos, não se consegue exactamente quantificar os alimentos ingeridos.

Dos elementos estudados, os que apresentaram ser mais úteis foram o bário, zinco, cobre e o cálcio. Os outros elementos, de acordo com outros estudos, devido ao grau de diagenese não foram parecem muito importantes no estudo da dieta por este método.

O número de amostras que foi possível usar neste estudo, foi relativamente baixo, tornando mais difícil a interpretação dos resultados. Outro aspecto que não foi favorável, foi o de não possuir nenhuma amostra de carnívoros.

O conjunto de técnicas utilizadas ao longo deste estudo, revelaram-se úteis e adequadas, destacando-se a espectroscopia de absorção atómica pela sua sensibilidade e elevado número de elementos que pode quantificar eficazmente. Para um estudo mais aprofundado da dieta do homem do sítio Paleolítico Lapa do Picareiro, seria importante proceder ao estudo do elemento estrôncio, na medida em que talvez com os valores de

bário/estrôncio, o estudo da dieta de animais marinhos ficaria mais esclarecida. Métodos complementares seriam importantes no estudo da dieta, como a análise da estriação dentária e uma análise de isótopos entre outros.

BIBLIOGRAFIA

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts K.; Watson J. D. (1990), "Molecular biology of the Cell" Third edition, p. 1184.

Araújo, M. T. (1996), "Os dentes: elementos de ouro nos estudos antropológicos", *Centro de Arqueologia de Almada*Al-madan*, IIª série, 5, p. 136.

Ballantine,B.; Lansdown, A.B.G. (1995); "General & Applied Toxicology, Abridged Edition, pp. 90, 679-686.

Bicho, N. F.; Hockett B.; Haus, J.; Belcher, W. "Hunter-gatherer subsistence at the end of Pleistocene: Preliminary Results from Picareiro Cave, Central Portugal"

Boaz, N. T. ; Hampel J. (1978), "Strontium Content of fossil tooth enamel and Diet of Early Hominids", *Journal of Paleontology*, 52, 4, pp. 928-933.

Boivin, G.; Deloffre, P.; Perrat, B.; Panczer, G.; Boudeulle, M.; Murras, Y.; Allain, P.; Tsouderos, Y.; Meunir, P. J. (1996), "Strontium Distribution and Interactions with Bone Mineral in Monkey Iliac Bone after Strontium Salt (S12911) Administration"; *Journal of Bone and Mineral Research*; II, 9, pp. 1302-1311.

Burton, J. H.; Price, T. D. (1990), “The Ratio of Barium to Strontium as a Paleodietary Indicator of Consumption of Marine Resources”; *Journal of Archaeological Science*; 17, pp. 547-557.

Byrne, K. B.; Parris, B. C. (1987), “Reconstruction of the Diet of the Middle Woodland Ameridian Population of Abbott Farm by Bone Trace-Element Analysis”; *American Journal of Physical Anthropology*, 74, pp. 373-384

Cabral, J. M. P. (1996), “Caracterização de Materiais Arqueológicos”; *Centro de Arqueologia de Almada*Al-madan*, IIª série, 5, pp. 122-130.

Cabrera, W. E.; Shrooten, I.; Broe, M. E.; D’ Haese, P. (1999), “Strontium and Bone”, *journal of Bone and Mineral Research*, 14, pp. 661-668.

Carlo Erba Instruments “Elemental Analyzer E.A. 1108” Instruction Manual.

Elias, E. M. (1980), “The Feasibility of Dental Strontium Analysis for Diet- Assessment of Human Populations”, *American journal of Physical Anthropology*, 53, pp. 1-4.

Fagan, B. M. (1998), “People of the Earth- An Introduction to World Prehistory”, Ninth Edition, Longman, pp. 124-133.

Gibson, R. S. (1994), “Content and Bioavailability of Trace Elements in Vegetarian Diets”, *American journal of Clinical Nutrition*, pp. 1223S-1232S.

Gonçalves, M. L., (1983), “ Métodos instrumentais para análise de soluções – Análise Quantitativa” Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa

Heslop, R. B.; Jones, H. (1987), “Química Inorgânica”, 2ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Kerstetter, J. E.; O’Brien, K.; Insogna, K. L. (1998), “Dietary Protein Affects Intestinal Calcium Absorption”, *American journal of Clinical Nutrition*, 68, pp. 859-865.

Lambert, J. B.; Weydert-Homeyer, J. M. (1993), “Fundamental Relationship Between Ancient Diet and Inorganic Constituents Of Bone as Derived from Feeding Experiments”, *Archaeometry*, 35, pp. 279-294.

Lambert, J. B.; Shawl, C. E.; Stearn, J. A. (2000), “Nuclear Magnetic Resonance in Archaeology”, *Chem. Soc. Rev.*, 29, pp. 175-182.

Lubell, D.; Jackes, M.; Schwarcz, H.; Knyf, M.; Meiklejohn, C. (1994), “The Mesolithic-Neolithic Transition in Portugal: Isotopic and Dental Evidence of Diet”, *Journal of Archaeological Science*, 21, pp. 201-216.

Maga, J. A. (1982), “Phytate: Its Chemistry, Occurrence, Food Interactions, Nutritional Significance, and Methods of Analysis”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 1, pp. 1-9

Merwe, N. J. van der; Roosevelt, A. C.; Vogel, J. C. (1981), “Isotopic Evidence for Prehistoric Subsistence Change at Parmana, Venezuela”, *Nature*, 292, pp. 536-538.

Richards, M. P.; Pettitt, P. B.; Trinkaus, E.; Smith, F. H.; Paunovic, M.; Karavanic, I. (2000), “Neanderthal Diet at Vindija and Neanderthal Predation: The Evidence from Stable Isotopes”, *PNAS*, 97, 13, pp. 7663-7666.

Sillen, A. (1992), “Strontium-Calcium ratios (Sr/Ca) of *Australopithecus robustus* and associated fauna from Swartkrans”, *Journal of Human Evolution*, 23, pp. 495-516.

Smith, R. E. (1990) ; “Ion Chromatography applications”, CRC press Inc, Third edition,

Sullivan, C. H.; Krueger, H. W. (1981), “Carbon isotope analysis of separate chemical phases in modern and fossil bone”, *Nature*, 292, pp. 333-335.

Teaford, M. F.; Ungar, P. S. (2000), “Diet and the evolution of the earliest human ancestors”, *PNAS*, 97, 27, pp. 13506-13511.

Umbelino, C. (1996), “A importância das análises de paleodieta”, *Centro de Arqueologia de Almada*Al-madan*, IIª série, 5, p. 138

Velasco-Vasques, J.; Arnay-de-la-Rosa, M.; González-Reimers, E.; Hernández-Torres, O. (1997), “Paleodietary Análisis on the Prehistoric Population of El Hierro (Canary Islands)”, *Biological Trace Element Research*, 59, pp. 207-213.

Voet D. ; Voet J.G. (1995) , “ Biochemistry ”, Second edition, John Wiley & Sons, Inc.