



Técnica de Extração de Palinomorfos em Cálculos Dentários de Gonfotérios Sul-Americanos
Technique of Palynomorphs Extraction from Dental Calculi of South American Gomphotheres

Shana Yuri Misumi^{1, 2}; Lidiane Asevedo^{3, 4};
Leonardo dos Santos Avilla³; Ortrud Monika Barth^{1, 5} & Marcia Aguiar de Barros¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Geociências, Departamento de Geologia, Laboratório de Palinologia, Rua Athos da Silveira Ramos 274, Cidade Universitária, 21941-916. Rio de Janeiro, RJ, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Geologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³ Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Laboratório de Mastozoologia, Avenida Pasteur, 458, Urca, 20290-240. Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵ Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brasil

E-mails: smisumi@yahoo.com.br; lidi.asevedo@gmail.com;

leonardo.avilla@gmail.com; barth@ioc.fiocruz.br; marcabarros@yahoo.com

Recebido em: 20/05/2015 Aprovado em: 21/12/2015

DOI: http://dx.doi.org/10.11137/2016_1_127_132

Resumo

Foi desenvolvida uma técnica de laboratório para a extração de palinomorfos de cálculos dentários de indivíduos do gonfotério sul-americano *Notiomastodon platensis*. As amostras foram retiradas de espécimes molares provenientes de localidades do Nordeste e do Sul do Brasil. O procedimento constituiu-se em etapas de maceração, adição de esporos exóticos de *Lycopodium clavatum*, reação com ácido clorídrico concentrado, lavagem com água destilada e tamisação por ultrassom. A preparação das lâminas com os palinomorfos obtidos fez uso de gelatina glicerinada. Foram recuperados grãos de pólen, esporos de pteridófitas e fragmentos de tecidos vegetais. Esta metodologia permite a extração e observação de outros microfósseis, como fitólitos, que também podem estar presentes em cálculos dentários de mamíferos herbívoros.

Palavras-chave: cálculo dentário; gonfotérios sul-americanos; palinomorfos; técnica de extração

Abstract

A laboratory technique was developed to extract palynomorphs from dental calculi of South American gomphotere *Notiomastodon platensis* individuals. The samples were obtained from molar specimens from Northeastern and Southern Brazil. The laboratory procedure consists in steps of maceration, addition of *Lycopodium clavatum* exotic spores, reaction with concentrated hydrochloric acid, washing with distilled water and sonication. Glycerin gelatin was used to prepare the microscope slides containing the microfossils. Pollen grains, pteridophyte spores and fragments of plant tissues were recovered. This methodology allows the extraction and observation of other microfossils, such as phytoliths, that might also be present in dental calculi of herbivorous mammals.

Keywords: dental calculus; South American gomphotheres; palynomorphs; extraction technique

1 Introdução

Os integrantes da família Gomphoteriidae constituíram a única fauna de proboscídeos do Pleistoceno da América do Sul. O gonfotério *Notiomastodon platensis* (Ameghino, 1888) é endêmico da América do Sul e a única espécie reconhecida para o Brasil (Mothé & Avilla, 2015). Esta espécie apresentava uma ampla distribuição geográfica, com registros em praticamente todos os estados da federação e, portanto, uma grande amplitude alimentar é inferida na literatura (Sánchez *et al.*, 2004; Asevedo *et al.*, 2012). A estratégia alimentar generalista provavelmente envolvia uma dieta rica em plantas herbáceas, como gramíneas, bem como significativas quantidades de ramos foliares e florais, frutos e porções lenhosas (Asevedo *et al.*, 2012).

Durante a alimentação, micropartículas alimentares podem aderir à superfície dentária, sendo incorporadas de forma progressiva à placa bacteriana, uma matriz composta por aglomerado de bactérias da flora bucal unido a componentes orgânicos da saliva. Processos de mineralização da placa bacteriana, principalmente por cálcio e fosfato provenientes da saliva, formam os cálculos dentários e resultam na sua aderência aos dentes. Desta forma, após resistirem aos processos de fossilização, os microfósseis vegetais (grãos de pólen, esporos de pteridófitas e briófitas, fitólitos e fragmentos de tecidos vegetais) observados nos cálculos dentários podem ser associados às espécies de plantas ingeridas pelos gonfotérios (Asevedo *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014).

O cálculo apresenta-se nos dentes como uma incrustação amarela clara à marrom, acima ou abaixo da linha da gengiva (supragengival/subgengival) (Armitage, 1975 e Gobetz & Bozarth, 2001). Na maioria das vezes, o acúmulo preenche as cavidades entre as cúspides dentárias e, para os gonfotérios, alguns autores (*e.g.* Alberdi *et al.*, 2008) acreditavam tratar-se do cimento, um tecido conjuntivo mineralizado que recobre a dentina conectando as cúspides dentárias (Driak, 1937).

Com o intuito de reconstruir a dieta de espécies atuais e extintas, vem sendo realizadas análises de fitólitos opalinos encontrados em cálculos dentários de mamíferos ungulados (Armitage, 1975 e Middleton & Rovner, 1994) e proboscídeos (Gobetz

& Bozarth, 2001), além de grãos de amido e fitólitos observados em cálculos de primatas (Henry, 2012) e de humanos pré-históricos (Henry *et al.*, 2011) e modernos (Piperno, 2006; Boyadjian, 2007; Henry & Piperno, 2008; Wesolowski *et al.*, 2010).

Para complementar tais estudos, a análise de grãos de pólen e esporos pode ser empregada e tornar-se uma importante ferramenta. Por possuírem uma parede altamente resistente constituída por esporopolenina (Traverse, 2007), estes microfósseis podem permanecer preservados e ser recuperados dos cálculos dentários (Asevedo *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Assim, a avaliação da assembleia esporopolínica permite a reconstituição do paleoambiente e a inferência dos táxons vegetais disponíveis para consumo pelas espécies pretéritas, como Silva *et al.* (2014) puderam verificar em amostras oriundas do Rio Grande do Sul.

Para alcançar estes objetivos a partir de cálculos dentários, uma metodologia distinta para recuperação e extração de cada um desses microfósseis vegetais é necessária. Gobetz & Bozarth (2001) extraíram fitólitos com uso de ácido clorídrico (HCl) diluído para dissolução da matriz cálcica e solução de Schulze (HNO₃ e KClO₃ em proporção de 3:1) para eliminação da matéria orgânica. Já Piperno (2006) sugere o tratamento com HCl (10%) e um agente oxidante como HNO₃, KClO₄ ou H₂O₂. Middleton & Rovner (1994), por sua vez, utilizaram apenas HCl para resgatar fitólitos, assim como Boyadjian (2007), Henry & Piperno (2008) e Wesolowski *et al.* (2010) para fitólitos e grãos de amido. Para grãos de pólen e esporos, no entanto, não há uma técnica específica. Em um estudo preliminar, Asevedo *et al.* (2012) extraíram grãos de pólen, esporos de pteridófitas e tecidos vegetais em amostras de cálculos dentários de *Notiomastodon platensis* provenientes de Minas Gerais usando somente HCl, seguindo a metodologia de Boyadjian (2007). Assim, devido à forte união dos elementos palinológicos à matriz do cálculo dentário, foi necessário aprimorar a tecnologia buscando recuperá-los. Outro propósito foi a remoção de elementos que pudessem dificultar a observação destes microfósseis.

A técnica aqui apresentada visa a extração de palinomorfos de cálculos dentários de gonfotérios sul-americanos, sendo aplicável também para outros grupos de mamíferos herbívoros.

2 Material Estudado

Para o presente trabalho, foram selecionados 12 espécimes de segundo e terceiro molares superiores e inferiores, bem como fragmentos de molares, de *Notiomastodon platensis* com acúmulo de tártaro (figura 1).

Os exemplares selecionados foram provenientes de Pernambuco (Alagoinha, Município de

Pesqueira), Sergipe (Sítios Novos, Município de Canhoba e Fazenda Elefante, Município de Gararu) e do Rio Grande do Sul (Fazenda M. Corsini, Município de Dom Pedrito e Arroio Chuí e Costa Atlântica, Município de Santa Vitória do Palmar).

Ao todo foram processadas 28 amostras de cálculos subgingivais e supragingivais.

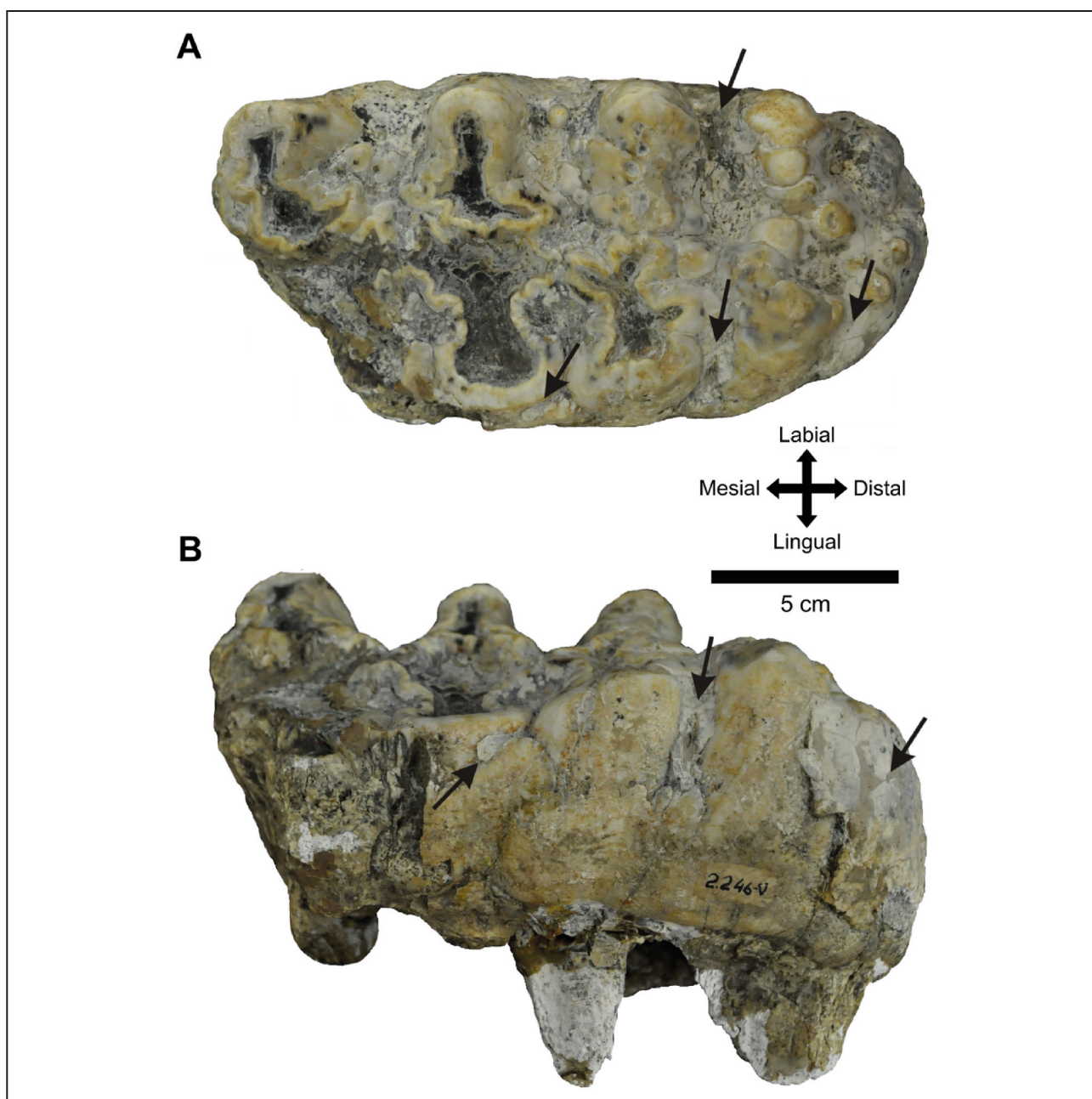


Figura 1 Terceiro molar superior esquerdo do gonfotério sul-americano *Notiomastodon platensis* da Fazenda M. Corsini, Dom Pedrito, Rio Grande do Sul (MN 2246-v, Coleção Paleontológica do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro): vista oclusal (A) e região lingual (B). As setas indicam o acúmulo de cálculo entre as cúspides dentárias e na região do tálon.

3 Técnica para Tratamento de Cálculo Dentário

Inicialmente, os molares foram limpos com acetona e etanol p.a. para a posterior retirada dos cálculos com uma cureta dentária. Após este procedimento, o material foi submetido às seguintes etapas:

- Maceração dos fragmentos de cálculo dentário, com auxílio de graal e pistilo, para otimizar a reação ácida;
- Transferência do cálculo em pó para vidro de relojoeiro e pesagem da amostra;
- Transferência do material para tubo de centrífuga de 15ml e adição de uma pastilha de esporos de *Lycopodium clavatum*;
- Adição gradual de ácido clorídrico (HCl) a 32%, para dissolução do cálculo em pó e da pastilha, até que todo o material esteja coberto pelo reagente;
- Centrifugação a 1500 rpm por 4 minutos e descarte do sobrenadante;
- Nova adição de HCl, centrifugação e descarte do sobrenadante;
- Lavagem com água destilada, centrifugação e descarte do sobrenadante (2 vezes);
- Peneiração do material sobre um becher para retirada de partículas minerais;
- Tratamento da amostra por ultrassom em malha de 5 µm durante 3 minutos;
- Transferência do material retido na malha para tubo de centrífuga com auxílio de água destilada, centrifugação e descarte do sobrenadante;
- Adição de água glicerinada (1:1), centrifugação e descarte do sobrenadante;
- Alocação dos tubos com a boca para baixo e repouso por 15 minutos.

A confecção das lâminas seguiu o procedimento aplicado em Palinologia do Quaternário, com a montagem de quatro lâminas permanentes para cada amostra, utilizando-se gelatina glicerinada e vedação com parafina.

4 Discussão

Uma pastilha com o número conhecido de esporos de *Lycopodium clavatum* foi adicionada a cada amostra a fim de calcular as concentrações esporopolínicas (Stockmarr, 1971). Considerado padrão em estudos em Palinologia do Quaternário por Ybert *et al.* (1992), o uso de *L. clavatum* foi proposto por Reinhard *et al.* (2001) para microfósseis encontrados em cálculos dentários arqueológicos. As concentrações esporopolínicas permitem avaliar a contribuição de cada tipo polínico de forma independente. Assim, é possível inferir sobre a composição da paleodieta de forma quantitativa e auxiliar na interpretação sobre possíveis preferências alimentares dos proboscídeos. A adição do esporo marcador, portanto, demonstra ser de grande relevância para os estudos sobre paleodieta.

Os estudos de cálculos dentários em proboscídeos realizados por Gobetz & Bozarth (2001) e Asevedo *et al.* (2012) foram baseados na aplicação de ácido clorídrico para a dissolução dos tártaros, constituindo uma etapa fundamental para a análise dos microfósseis. Devido a pouca quantidade de material fóssil disponível de cada dente, foi elaborado um procedimento com a utilização mínima de reagentes.

A técnica da acetólise (Erdtman, 1952), indicada para a remoção de matéria orgânica, não foi empregada na presente metodologia a fim de evitar danos adicionais aos palinomorfos, provavelmente já comprometidos pelos processos de mastigação dos mamíferos e de fossilização pouco favorável em matriz cálcica.

A utilização de ultrassom, segundo a técnica aqui aplicada e descrita, aumentou a possibilidade de recuperação de palinomorfos (figura 2) por meio da desagregação e dispersão dos componentes remanescentes do cálculo dentário após a reação ácida.

A presente metodologia, por não empregar ácido fluorídrico, permite ainda extrair e observar fitólitos e outros microfósseis silicosos, que possam estar contidos nos cálculos dentários de proboscídeos e de outros mamíferos herbívoros.

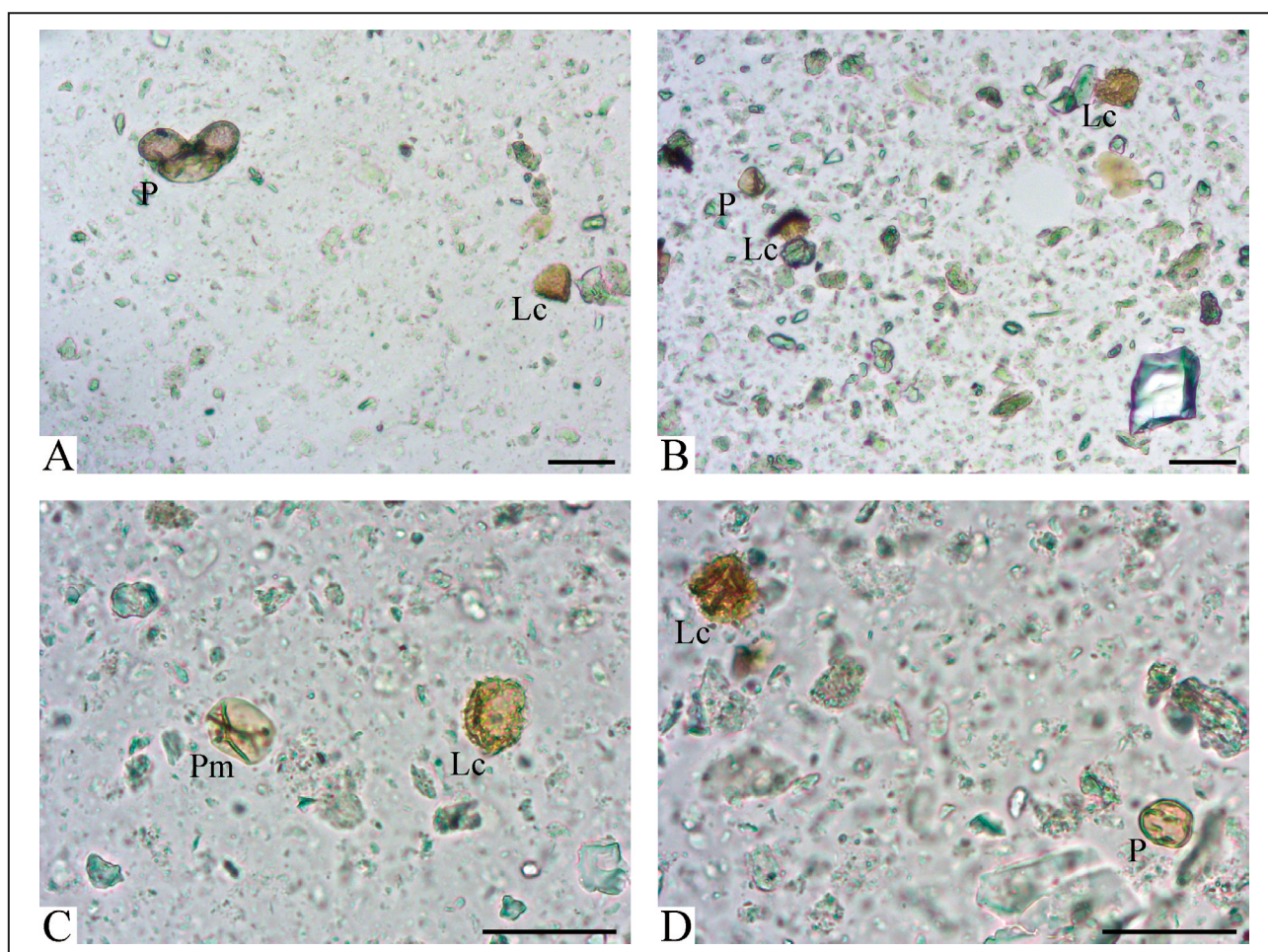


Figura 2 Vista geral de lâminas palinológicas confeccionadas após a técnica de extração de palinomorfos de cálculos dentários de *Notiomastodon platensis*, mostrando alguns grãos de pólen (P), esporos de *Lycopodium clavatum* (Lc), palinomorfos indeterminados (Pm) e numerosos cristais de sílica. Escala = 50µm

5 Considerações Finais

A técnica proposta possibilitou a recuperação de palinomorfos, apesar da pequena quantidade de amostras individuais de cálculos dentários de *Notiomastodon platensis*. A aplicação adicional do ultrassom beneficiou a visualização da morfologia dos microfósseis. A análise da concentração dos palinomorfos pode indicar preferências alimentares de mamíferos herbívoros e, portanto, tornar-se uma excelente ferramenta complementar a estudos tradicionais de reconstruções paleoalimentares.

6 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Mário André Trindade Dantas pelo acesso ao Laboratório de Paleontologia, da Universidade Federal de Sergipe,

e ao Memorial de Sergipe, da Universidade Tiradentes. Às coleções de mamíferos fósseis da Fundação Zoobotânica e do Museu Municipal Coronel Tancredo Fernandes de Mello (RS). Ao Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Apoio Técnico de Nível Superior concedida a S.Y. Misumi (Processo nº 370352/2013-0), pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a O.M. Barth (Processo nº 304067-2012/0) e pelo auxílio (Processo nº 486239/2012-8). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de Mestrado concedida a L. Asevedo, através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

7 Referências

- Alberdi, M.T.; Cerdeño, E. & Prado, J.L. 2008. *Stegomastodon platensis* (Proboscidea, Gomphotheriidae) en el Pleistoceno de Santiago del Estero, Argentina. *Ameghiniana*, 45(2): 257-271.
- Armitage, P.L. 1975. The extraction and identification of opal phytoliths from the teeth of ungulates. *Journal of Archaeological Science*, 2: 187-197.
- Asevedo, L.; Winck, G.R.; Mothé, D. & Avilla, L.S. 2012. Ancient diet of the Pleistocene gomphothere *Notiomastodon platensis* (Mammalia, Proboscidea, Gomphotheriidae) from lowland mid-latitudes of South America: Stereomicrowear and tooth calculus analyses combined. *Quaternary International*, 255: 42-52.
- Boyadjian, C.H.C. 2007. *Microfósseis contidos no cálculo dentário como evidência do uso de recursos vegetais nos sambaquis de Jabuticabeira II (SC) e Moraes (SP)*. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado, 147p.
- Driak, F. 1937. Anatomical and histological examination of the structure and development of the elephant molar. *Journal of Dental Research*, 16(2): 73-80.
- Erdtman, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms (An introduction to Palynology. I). Stockholm, Almquist & Wiksell. 539p.
- Gobetz, K.E. & Bozarth, S.R. 2001. Implications for Late Pleistocene mastodon diet from opal phytoliths in tooth calculus. *Quaternary Research*, 55: 115-122.
- Henry, A.G. 2012. Recovering dietary information from extant and extinct primates using microremains. *International Journal of Primatology*, 33: 702-715.
- Henry, A.G. & Piperno, D.R. 2008. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raq'i, Syria. *Journal of Archaeological Science*, 35: 1943-1950.
- Henry, A.G.; Brooks, A.S. & Piperno, D.R. 2011. Microfossils in calculus demonstrate consumption of plants and cooked foods in Neanderthal diets (Shanidar III, Iraq; Spy I and II, Belgium). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2): 486-491.
- Middleton, W.D. & Rovner, I. 1994. Extraction of Opal Phytoliths from Herbivore Dental Calculus. *Journal of Archaeological Science*, 21: 469-473.
- Mothé, D. & Avilla, L. 2015. Mythbusting evolutionary issues on South American Gomphotheriidae (Mammalia: Proboscidea). *Quaternary Science Reviews*, 110: 23-35.
- Piperno, D.R. 2006. *Phytoliths: a comprehensive guide for archaeologists and paleoecologists*. Nova York, Altamira Press. 238p.
- Reinhard, K.J., Mendonça de Souza, S.F., Rodrigues, C., Kimerle, E. & Dorsey-Vinton, S., 2001. Microfossils in dental calculus: a new perspective on diet and dental disease. In: WILLIAMS, E. (ed.) *Human remains: Conservation, retrieval and analysis*. BAR International Series 934, p. 113-118.
- Sánchez, B.; Prado, J.L. & Alberdi, M.T. 2004. Feeding Ecology, dispersal and extinction of South American Pleistocene gomphotheres (Gomphotheriidae, Proboscidea). *Paleobiology* 30 (1): 146-161.
- Silva, L.A.; Misumi, S.Y.; Barros, M.A.; Barth, O.M.; Avilla, L.S. & Dantas, M.A.T. 2014. Extração polínica dos cálculos dentários de *Notiomastodon platensis* (Ameghino, 1888) (Gomphotheriidae: Mammalia) do Pleistoceno Tardio de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, Brasil. In: PALEO RJ/ES, Rio de Janeiro, 2014. *Resumos*, Rio de Janeiro, Museu Nacional, p.3.
- Stockmarr, J. 1971. Tablets spores used in absolute pollen analysis. *Pollen et Spores*, 13 (4): 615-621.
- Traverse, A. 2007. *Paleopalynology*. 2 ed. Hardbound: Springer Netherlands. 813p. (Topics em Geobiology, v.28).
- Wesolowski, V.; Souza, S.M.F.M.; Reinhard, K.J. & Ceccantini, G. 2010. Evaluating microfossil content of dental calculus from Brazilian sambaquis. *Journal of Archaeological Science*, 37: 1326-1338.
- Ybert, J.-P.; Salgado-Labouriau, M.L.; Barth, O.M.; Lorscheitter, M.L.; Barros, M.A.; Chaves, S.A.M.; Luz, C.F.P.; Ribeiro, M.; Scheel, R. & Vicentini, K.F. 1992. Sugestões para padronização da metodologia empregada em estudos palinológicos do Quaternário. *Revista do Instituto Geológico*, 13 (2): 47-49.