

Ana Carolina Figueiredo Viana Jorge

**Análise de microvestígios vegetais em cálculos dentários humanos do sambaqui de
Cabeçuda**

Rio de janeiro

2018

Ana Carolina Figueiredo Viana Jorge

**Análise de microvestígios vegetais em cálculos dentários humanos do sambaqui de
Cabeçuda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Área de Concentração: Abordagem ecológica de doenças transmissíveis.

Orientadoras:
Sheila Mendonça de Souza
Veronica Wesolowski

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

J82a Jorge, Ana Carolina Figueiredo Viana.
análise de microvestígios vegetais em cálculos dentários
humanos do Sambaqui de Cabeçuda / Ana Carolina Figueiredo
Viana Jorge. -- 2018.
65 f. : il. color. ; tab.

Orientadoras: Sheila Mendonça de Souza e Veronica
Wesolowski.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola
Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro,
2018.

1. Amido. 2. Cálculos Dentários. 3. Cárie Dentária.
4. Grupos Populacionais. 5. Sambaquis. I. Título.

CDD – 23.ed. – 617.67

Ana Carolina Figueiredo Viana Jorge

**Análise de microvestígios vegetais em cálculos dentários humanos do sambaqui de
Cabeçuda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública. Área de Concentração: Abordagem ecológica de doenças transmissíveis.

Aprovada em 23 de setembro de 2016.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Celia Helena Cezar Boyadjian

Museu Nacional - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dr.^a Joseli Maria da Rocha Nogueira

Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a Veronica Wesolowski de Aguiar e Santos (segunda orientadora)

Museu de Arqueologia e Etnologia - Universidade de São Paulo

Sheila Maria Ferraz Mendonça de Souza (orientadora principal)

Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

Ao Arthur, que em meio a toda ambigüidade da desistência e resiliência me faz olhar para o passado e o futuro, e encontrar formas de renovação.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sheila, por me encantar com o mundo da arqueologia com todo seu entusiasmo e sabedoria. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência, puxões de orelha merecidos e confiança.

À Dra. Verônica, pela oportunidade de participar e aprender sobre o mundo dos amidos arqueológicos.

Ao Dr. Professor Sergio Chaves, por compartilhar seu laboratório, sua paciência e ensinamentos durante esses dois anos.

Ao meu Hugo, marido, amor, amigo, companheiro para todas as horas. Por todo incentivo e esforço que não foram medidos pra me ajudar nessa caminhada, desde as horas de estudo para prova do mestrado até aqui. Por todo apoio necessário para que eu pudesse concluir o curso em meio aos caos de ter um filhote pequeno em casa e toda culpa que a maternidade traz consigo, ficando ao lado do nosso filho na minha ausência. Obrigada por tudo!

Ao Arthur, meu filho, que nasceu durante essa jornada, trazendo com ele a maior alegria que poderia ter nessa vida. Fazendo-me seguir em frente, mas muitas vezes me desacelerando, para que pudesse observar atentamente, em meio ao caos diário, os pequenos detalhes e alegrias da vida.

À minha família, por sempre estar ao meu lado. E à minha segunda família, que ganhei ao lado de Hugo, sempre preocupados e torcendo por mim. Obrigada!

Aos companheiros que tive a oportunidade de conhecer na ENSP, que tanto me incentivaram: Ricardo, Maíra, Bruna, Morgana e Victor.

Aos laboratórios de Paleoparasitologia e Ecologia da Escola Nacional de Saúde Pública, por toda ajuda técnica e disponibilidade de equipamentos e materiais dos laboratórios sem os quais esse trabalho não teria sido possível.

RESUMO

Informações sobre o componente vegetal da dieta de povos pré-históricos construtores de sambaquis ainda são escassas. Em cálculos dentários, pode-se encontrar grânulos de amido, vestígios da dieta vegetal destes indivíduos, uma vez que durante a formação dos cálculos estes microrresíduos são aprisionados em sua matriz, podendo ser extraídos, analisados e em alguns casos identificados, fornecendo informações sobre o consumo de alimentos amiláceos, identificando o vegetal de origem e até mesmo obtendo informações sobre um possível processamento que possam ter sofrido. Os carboidratos têm grande importância na dieta humana, conseqüentemente na saúde geral e bucal. Uma vez que os alimentos amiláceos têm papel importante no desenvolvimento da cárie dentária, os resultados deste trabalho proporcionam dados para a elucidação de um questionamento a respeito da ausência de cáries no sambaqui de Cabeçuda (Laguna, SC). Os resultados de achados de grânulos de amido foram interpretados como contaminação por amido atual, considerando a inexistência de grânulos de amido provenientes dos cálculos dentários estudados. Diante deste resultado, supõe-se um baixo consumo de alimentos amiláceos pelos povos estudados, este baixo consumo, junto com outros fatores apresentados na literatura, parece ter relação com a ausência de cárie apresentada nos dentes de indivíduos deste sítio.

Palavras-chave: amido, cálculos dentários, cárie, sambaquis.

ABSTRACT

Information about the vegetable component from diet of pre-historic Brazilian shell mounds builders is very poor. In dental calculus, may be found starch granules, from the diet once this component is entrapped in dental calculus matrix. These granules can be extracted and sometimes identified; creating data about the use of starchy vegetables that may have been consumed, sometimes identifying the vegetables, as well as if they have been through any food processing. Carbohydrates are very important in the human diet, thus in general and oral health. Once starchy foods play an important role in the development of dental caries, the results of this study provide data to help elucidate a question about the lack of dental caries in the sambaqui of Cabeçuda. The findings of starch granules on the samples were interpreted as modern starch contamination, and it was considered the inexistence of starch granules from dental calculus. Given this result, it is assumed a low consumption of starchy foods by the group studied, this low consumption, along with other factors in the literature, seems to be related to the absence of dental caries presented in the teeth of individuals from this site.

Key words: starch, dental calculus, dental caries, shell mounds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Grânulos de amido de inhame (*Dioscorea* sp.) sob luz transmitida (A) e luz polarizada (B). Fonte: Coleção de referência – Foto: Ana Carolina Figueiredo **12**
- Figura 2. Vista do sambaqui de Cabeçuda (CASTRO FARIA, 1955) **31**
- Figura 3. Grânulos de amido de cálculos dentários do sambaqui de Cabeçuda, série 1. Aumento de 400x. A: Amostra 234#1, B Amostra 236#1, C: Amostra 238#1, D: Amostra 240#1, E: Amostra 240#2, F: Amostra 242#1, G: Amostra 242#2, H: Amostra 242#2 (2), I: Amostra 244#1, J: Amostra 244#2. **44**
- Figura 4. Grânulos de amido encontrados nas amostras controle da Série 1. Aumento de 400x **45**
- Figura 5. Grânulos de amido nos cálculos do sambaqui de Cabeçuda, série 2. Aumento de 400x. A: Amostra 268#1, B Amostra 268#2, C: Amostra 269#2, D: Amostra 269#2 (2), E: Amostra 269#2 (3), F: Amostra 270#1, G: Amostra 270#2, H: Amostra 270#2 (2) (2), I: Amostra 270#2(3), J: Amostra 270#2(4), K: Amostra 270#2 (5), L: Amostra 270#3. M: Amostra 271#1, N: Amostra 271#1 (2) **46**
- Figura 6. Grânulos de amido nos cálculos do sambaqui de Cabeçuda, série 2 (2). Aumento de 400x. A: Amostra 271#2, amido sugestivo de batata doce (modificado?) B Amostra 271#2 (2), C: Amostra 272#2, D: Amostra 272#2 (2), E: Amostra 272#4 (3), F: Amostra 274#2, G: Amostra 274#2 (2), H: Amostra 275#1, I: Amostra 275#1, J: Amostra 275#2, K: Amostra 275#2 (2), L: Amostra 276#1, M: Amostra 277 #1, N: Amostra 277 #1 (2), O: Amostra 277 #1 (3) **47**
- Figura 7. Grânulos de amido nos cálculos do sambaqui de Cabeçuda, série 2 (2). Aumento de 400x. A: Amostra 278#1, B Amostra 278#1 (2), C: Amostra 278#1 (3), D: Amostra 278#1 (4), E: Amostra 278#1 (5), F: Amostra 279#1, G: Amostra 279#1 (2), H: Amostra 280#1, I: Amostra 280#1 (2), J: Amostra 280#1 (3), K: Amostra 280#2, L: Amostra 281#1, M: Amostra 281 #2 **48**
- Figura 8. Grânulos de amido encontrados nas amostras controle da Série 1. Aumento de 400x **49**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1. AMIDO.....	11
2.2. AMIDO EM MATERIAL ARQUEOLÓGICO	15
2.3. AMIDO MODIFICADO: DESAFIOS DE SUA IDENTIFICAÇÃO.....	19
2.4. SAÚDE BUCAL X ALIMENTAÇÃO	23
2.5. SAMBAQUIS.....	27
2.5.1. O sambaqui de cabeçuda	29
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVOS GERAIS	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. ESCOLHA E RETIRADA DOS CÁLCULOS	36
4.2. PROCESSAMENTO DOS CÁLCULOS E MONTAGEM DAS LÂMINAS	37
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	50
6.1. QUESTÕES METODOLÓGICAS	50
6.2. A AUSÊNCIA DE AMIDO IDENTIFICÁVEL E SEU SIGNIFICADO PARA A SAÚDE BUCAL NO CABEÇUDA.....	53
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Na dieta de povos pré-históricos construtores de sambaquis, a parte protéica é bem conhecida e valorizada nas pesquisas, no que se refere à parcela oriunda de peixes, moluscos e animais terrestres (FIGUTI, 1993; SCHEEL-YBERT et al., 2003). Já informações sobre o consumo vegetal destes povos são escassas, tendo tido inicialmente como evidências diretas apenas algumas sementes e coquinhos queimados encontrados em sítios arqueológicos (SCHEEL-YBERT, 1999, 2001; SCHEEL-YBERT et al., 2003). Após algum tempo outras técnicas para a recuperação da parte vegetal da dieta foram sendo usadas, iniciando-se no Brasil com a antracologia, que permitiu discutir a presença de raízes comestíveis naqueles sítios, e progredindo com os achados de grânulos de amidos em coprólitos e cálculos dentários, sugerindo que estes povos faziam uso de alimentos amiláceos também (BOYADJIAN, 2007, 2012, SCHEEL-YBERT, 1999, 2001; SCHEEL-YBERT et al., 2003; TEIXEIRA, 2010; WESOLOWSKI, 2007).

Devido à relevância dos carboidratos na nutrição humana e a grande relação com a saúde, o estudo da parte vegetal da dieta de povos pré-históricos se faz necessário e importante, tendo grande impacto nas inferências sobre a saúde destes grupos. Quer seja complementando estudos sobre o balanço energético dos alimentos, quer seja para ajudar a compreender a saúde dentária. Com o estudo dos amidos também é possível inferir sobre as tecnologias empregadas na preparação dos alimentos, como o uso do calor, principalmente o fogo, por estes povos.

A pesquisa sobre o amido encontrado em sítios arqueológicos, só se estabeleceu nos últimos 20 anos, porém seu potencial já havia sido reconhecido há um século (BECK; TORRENCE, 2006; WITTMACK, 1905). Houve certa demora até que os estudiosos usassem essa valiosa fonte de informação sobre o ambiente do passado, as plantas utilizadas, a dieta, e mesmo a função de artefatos, devido à dificuldade de encontrar tais restos vegetais preservados. Nos registros arqueológicos o amido pode ser encontrado em diversos tipos e locais de deposição, e em várias partes do mundo, mas principalmente em cavernas secas, que fornecem condições ideais para a recuperação do mesmo. Entretanto, ele também pode ser recuperado em lugares cujas condições de preservação dos componentes orgânicos são extremamente pobres, como em sítios abertos (TORRENCE; BARTON, 2006).

Nas regiões tropicais úmidas, por sua vez, é grande a dificuldade de encontrar restos vegetais preservados. Por isso o estudo dos amidos conservados na forma de microvestígios no cálculo dos dentes passou a representar um grande potencial para a reconstituição das dietas pré-históricas a partir dos restos humanos sepultados em diferentes sítios, mesmo em áreas abertas. Como os microvestígios vegetais estão incorporados à matriz dos cálculos dentários, podem estar mais bem protegidos podendo então fornecer registro direto de plantas que passaram pela boca. Adiciona-se a isso a vantagem de remeterem mais diretamente a dieta, na medida em que estão preservados no ambiente em que foram consumidos, ou seja, na boca. Revelam constituintes da dieta do indivíduo ou, pelo menos, de produtos e plantas que foram mascadas, cortadas ou desfibradas com os dentes, já que estes também podem fazer o papel de “ferramentas” para alguns destes povos (HENRY & PIPERNO, 2008; REINHARD et al., 2001; BOYADJIAN, 2012; HARDY 2005).

O estudo dos microvestígios como o amido pode fornecer informações úteis sobre como se desenvolveu o uso ou o maior consumo de alimentos ricos em carboidratos, ajudando a inferir sobre o manejo de plantas e até mesmo sobre sua domesticação. Seu estudo contribui para o registro da presença de horticultura como uma forma de produção de alimentos. Sobre os microvestígios da dieta destaca-se estudo anterior feito na Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, cujos resultados foram os primeiros para uma série arqueológica numerosa de amostras, e publicados dentro e fora do país (WESOLOWSKI et al., 2007, 2010). Nesta tese foi confirmada não apenas a presença de fitólitos e amidos em todas as séries esqueléticas de sambaquis estudados, mas também confirmado o potencial deste tipo de estudo para a compreensão do processo saúde-doença, através de uma correlação positiva entre o tipo de amido encontrado e a frequência elevada de cárie dentária em um dos grupos estudado.

Devido ao pouco investimento em estudos de microvestígios em materiais arqueológicos, entretanto, o conhecimento atual sobre o uso e consumo de vegetais pelos povos pré-históricos em áreas tropicais ainda é escasso, ainda que saibamos que este conhecimento é importante para ajudar a entender os diferentes estilos de vida e adaptabilidade na pré-história. Uma vez que a dieta está fortemente relacionada à saúde os microvestígios são atualmente uma das chaves para a compreensão de alguns processos relacionados à mesma (CHAVES; REINHARD, 2006; WESOLOWSKI et al., 2007).

Tendo a ingestão de carboidratos fermentáveis, como os vegetais amiláceos, papel importante no desenvolvimento da cárie dental, o estudo se faz importante, principalmente no que diz respeito à saúde bucal dos grupos que foram sepultados no sítio escolhido para o presente trabalho, o sambaqui de Cabeçuda. Análises de arcadas dentárias provenientes de sepultamentos deste sítio mostraram ausência de cárie, e o motivo para tal fenômeno ainda não ter sido elucidado torna importante a obtenção de mais informações sobre o consumo destes vegetais pelos grupos em questão.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. AMIDO

Distribuído em diversas espécies vegetais como um carboidrato de reserva, os grânulos de amido são encontrados em maior quantidade em grãos de cereais (40% a 90% do peso seco), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos (65% a 85% do peso seco) e frutas imaturas ou verdes (40% a 70% do peso seco), tal como indicam Denardin e Silva (2009). Para a maioria das culturas, o amido é também a maior fonte de energia para o ser humano, tornando-se reserva energética na forma de glicogênio no fígado e como componente das membranas celulares. Estocado na forma de reserva, poupa as proteínas da função energética, mantendo-as para sua função de construção de tecidos (FAO/WHO, 1997, 1998; PACHECO, 2006).

A síntese de amido se inicia com o processo de fotossíntese. Esse processo se inicia dentro de cloroplastos, os plastídios verdes, organelas intracelulares que dão cor verde às plantas. A energia da luz solar inicia uma série de reações que quebram água em hidrogênio e oxigênio, e depois recombinam o hidrogênio livre com dióxido de carbono absorvido do ar ambiente para formar a molécula da glicose. Parte desta glicose é levada dos cloroplastos para órgãos de estocagem das plantas, onde, dentro de unidades especializadas chamadas amiloplastos (plastídios de amido), a glicose vai ser convertida em amido reserva. Quando a planta necessita de energia, o amido reserva é convertido novamente em glicose e transportado para as partes da planta onde é necessitado (PREISS, 2009).

O amido é constituído basicamente por dois tipos de polímeros de glicose, um de estrutura linear, a amilose, e um de estrutura ramificada, a amilopectina. Estes dois compostos são organizados dentro dos amiloplastos de forma alternada ao redor de um ponto inicial chamado hilo. A estrutura amilose-amilopectina é geneticamente controlada, o que faz com que a morfologia do grânulo seja caracterizada para os grupos taxonômicos, possibilitando então a identificação do vegetal de origem (GALLANT; BOUCHET; BALDWIN, 1997)

Quando observados em luz polarizada, os grânulos se mostram birrefringentes, apresentando uma estrutura tipo “Cruz-de-malta”. Entretanto, essa birrefringência não tem relação com uma forma cristalina, e sim com o alto grau de orientação molecular interna à

estrutura da organela (BILIADERIS, 2009; COULTATE, 2004; DENARDIN; SILVA, 2009; SANTOS, 2009).

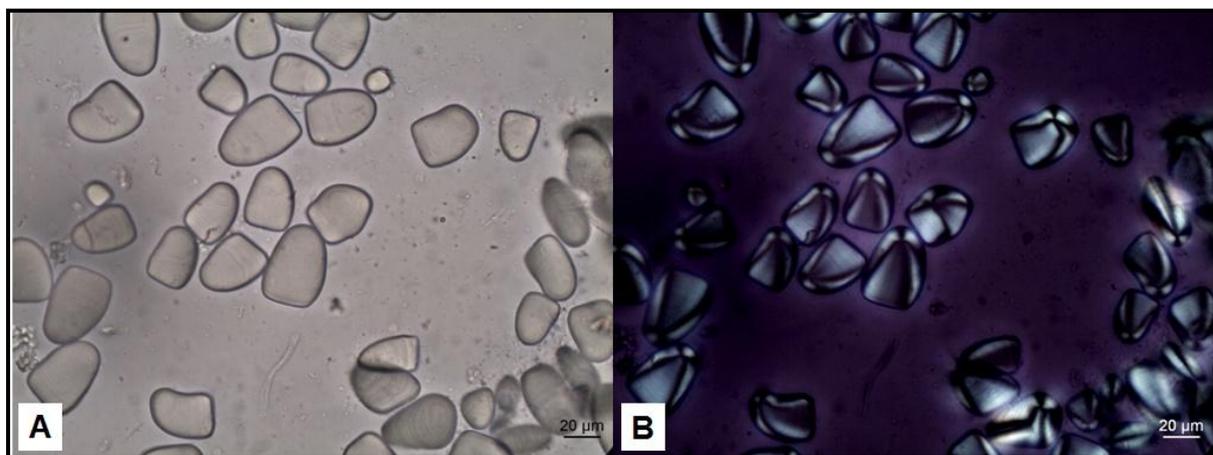


Figura 1 Grânulos de amido de inhame (*Dioscorea* sp.) sob luz transmitida (A) e luz polarizada (B). Fonte: Coleção de referência – Foto: Ana Carolina Figueiredo.

O amido é encontrado em quase todos os tecidos das plantas, inclusive em folhas, raízes e caules; mas os amidos que mais exploramos para fins econômicos e principalmente nutricionais estão nas raízes, tubérculos, frutos e sementes (PREISS, 2009). A localização e a densidade do grânulo de amido podem variar dependendo do órgão de estoque. Por exemplo, nas batatas há maior quantidade de amido nas partes maduras dos tubérculos. Já no inhame e na mandioca há diferentes padrões de distribuição de amido nos órgãos de estocagem (TORRENCE; BARTON, 2006).

Os amidos podem ser classificados como simples, quando cada amiloplasto contém somente um grânulo. Também podem ser classificados como compostos, quando formados por vários sub-grânulos que se formam dentro de apenas um amiloplasto, mesmo neste tipo de grânulo, cada um exibe sua própria cruz de polarização. Algumas plantas produzem amidos semi-compostos, que começam como amidos compostos, mas seus sub-grânulos se fundem, tendo como resultado final, várias subunidades sem nenhuma separação, gerando uma camada de grânulos amorfos, podendo conter mais de um hilo (PEREDA, 2005; TORRENCE; BARTON, 2006).

O tamanho dos grânulos está relacionado à quantidade de água que há dentro dele, e sua maturação também influencia este fator; grãos imaturos são menores que grãos maduros.

O estado nutricional da planta também pode afetar o tamanho dos grânulos. Algumas plantas, quando estressadas, produzem menos carboidrato, conseqüentemente grânulos menores (TORRENCE; BARTON, 2006).

Apesar do grânulo de amido variar de forma e tamanho, suas propriedades gerais são típicas. Geralmente, grânulos de amido podem ser distinguidos com relativa facilidade de outros componentes microscópicos de plantas. O hilo é o ponto a partir de onde o grânulo começa a se formar. Ele é comumente situado próximo ao centro do grânulo, mas também pode ser excêntrico, em direção ao final do grânulo, como na batata (*Solanum tuberosum*) e no inhame (*Dioscorea sp.*). Em algumas espécies há fissuras que emanam do hilo. Lamelas, que são camadas de crescimento ou de formação dos grânulos, são visíveis em grânulos grandes e em grânulos de certas espécies (PERÉZ; BALDWIN; GALLANT, 2009).

Como a relação amilose-amilopectina é geneticamente dependente, a forma, tamanho e estrutura dos grânulos de amido variam entre as fontes botânicas. O tamanho dos grânulos pode variar de 1µm até mais de 100µm, dependendo da fonte botânica analisada. Suas formas podem ser tanto regulares, como esféricas, ovóides ou angulares, quanto ser extremamente irregulares (THOMAS; ATWELL, 1999).

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria, podendo absorver uma pequena quantidade de água, o que causa um pequeno inchamento. Quando a temperatura aumenta, as moléculas vibram e rompem as ligações intermoleculares, estabelecendo pontes de hidrogênio com a água. Isto provoca o inchamento do grânulo e a diminuição das suas áreas cristalinas, como demonstra a perda da birrefringência após a exposição ao cozimento. Se o tratamento térmico for contínuo, como nos alimentos bem cozidos, os grânulos podem se romper devido à forte pressão que exercem uns contra os outros. Quando a birrefringência desaparece tem-se o chamado ponto ou temperatura de gelatinização (BABOT, 2003; BECK; TORRENCE, 2006; CAMERON; DONALD, 1993). Contudo, a gelatinização do amido, não depende somente da temperatura, mas também de outros componentes da solução, que podem modificar o tempo de inchamento dos grânulos. Tais componentes podem ser açúcares, proteínas, gorduras e ácidos. Esta gelatinização faz com que o amido fique mais acessível à ação de enzimas e, portanto, mais facilmente digerido, o que aumenta seu rendimento nutricional (BECK; TORRENCE, 2006; FREITAS; LEONEL, 2009; LINEBACK; WONGSRIKASEM, 1980; LOBO; SILVA, 2003; PEREDA, 2005).

A digestão do amido começa na boca, onde a enzima α -amilase salivar atua de maneira aleatória hidrolisando parte dos carboidratos. No estômago não há hidrólise de carboidratos, pois o pH alto do mesmo inativa a enzima α -amilase salivar. Após chegar ao intestino delgado, o conteúdo do estômago é neutralizado pelo bicarbonato secretado pelo pâncreas, permitindo que a enzima α -amilase pancreática continue a hidrólise de carboidratos, inclusive do amido. A digestão final do amido ocorre no jejuno superior pela ação de enzimas como a isomaltase, a sacarase, a maltase e a lactase que hidrolisam os produtos da degradação primária do amido (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

A taxa de hidrólise e absorção do amido pode ser influenciada por diferentes fatores. Como o amido de diferentes espécies vegetais tem diferenças importantes na sua composição e comportamento químico, sua hidrólise e absorção dependem da sua origem botânica, que influencia a relação amilose/amilopectina, o grau de cristalinidade e sua forma física e na quantidade de amido presente no alimento. Estes são os principais fatores intrínsecos aos alimentos, mas também devem ser consideradas as interações ocorridas entre o amido e outros constituintes do alimento, como a presença de complexos amido-lipídeos e amido-proteínas, que funcionam como inibidores de α -amilase; ou ainda polissacarídeos não-amiláceos presentes na dieta. Entre os fatores extrínsecos, está o tempo da mastigação, que determina a acessibilidade física do amido contido nos componentes rígidos do alimento às enzimas, o tempo do trânsito do alimento desde a boca até o íleo terminal, a concentração de amilase no intestino e também o tipo de processamento ao qual o alimento foi submetido. Dessa forma, uma quantidade de amido sempre pode escapar da digestão e chegar ao cólon onde vai ser fermentado. Este amido é chamado amido resistente (AR). O amido resistente é representado pelo amido e produtos de sua degradação que não são absorvidos no intestino delgado de indivíduos saudáveis (CUMMINGS; ROBERFROID, 1997; WALTER; SILVA; EMANUELLI, 2005; WALTER; SILVA; PERDOMO, 2005).

2.2. AMIDO EM MATERIAL ARQUEOLÓGICO

O amido tem sido útil na investigação do uso de vegetais por grupos humanos do passado através da recuperação, identificação e análise do mesmo. Graças ao fato dos grânulos apresentarem diferentes morfologias e características, se faz possível tentar identificar sua origem vegetal quando recuperados em contextos arqueológicos.

Os primeiros trabalhos que utilizaram grânulos de amido para identificar o *taxon* de vegetais preservados por dessecação foram os trabalhos de Ugent e colaboradores, que demonstraram que os grânulos de amido podem se preservar ao longo do tempo e que estes grânulos de amido podem apontar para a sua origem vegetal (UGENT; DILLEHAY; RAMIREZ, 1987; UGENT; POZORSKI; POZORSKI, 1982, 1986).

Nos registros arqueológicos o amido tem sido encontrado em diversos tipos e locais de deposição, e em várias partes do mundo, estando presente em diferentes materiais arqueológicos como alimentos preservados por carbonização, artefatos, coprólitos, amostras de solo, além de cálculos dentários (BOYADJIAN, 2007, 2012; BUCKLEY et al., 2014; HART; IVES, 2013; HENRY; BROOKS; PIPERNO, 2011b; HENRY; PIPERNO, 2008; HORROCKS et al., 2004; PIPERNO et al., 2000; PIPERNO; DILLEHAY, 2008; PIPERNO; HOLST, 1998; WESOŁOWSKI et al., 2007; ZARRILLO; KOOYMAN, 2006).

Informações sobre dietas de povos antigos, obtidas apenas a partir de estudos de depósitos arqueológicos ou sugeridas pelas partes vegetais encontradas em artefatos, por exemplo, podem levar a interpretações incompletas, ou vieses de interpretação. Tais registros podem incluir, por exemplo, o uso de plantas que não foram ingeridas, embora possam ter sido utilizadas e mesmo processadas, e podem deixar de lado outras cujas evidências não sejam localizadas como frutas e tubérculos assados.

Para contornar este problema, e aproximar-se mais do que realmente teria sido o alimento consumido, passou-se a investigar também microvestígios preservados em cálculos dentários, já que estes representam a parcela de vegetais que foram expostos e desfeitos no ambiente da boca, aumentando a probabilidade de terem sido ingeridos (BOYADJIAN, 2007, 2012; HARDY et al., 2009; HENRY; BROOKS; PIPERNO, 2011a; HENRY; PIPERNO, 2008; PIPERNO; DILLEHAY, 2008; WESOŁOWSKI et al., 2007).

Henry; Brooks e Piperno, (2011a) encontraram microvestígios em cálculos dentários, que sugerem o consumo de vegetais na dieta de neandertais na Bélgica e no Iraque. O mesmo estudo mostrou também que várias das plantas consumidas teriam sido cozidas, indicando que estes povos investiam tempo e trabalho preparando estes vegetais, o que os tornava mais digeríveis, aumentando sua qualidade nutricional. Parte deste conhecimento se baseia no fato de que as plantas identificadas iriam requerer um nível maior de preparação e não poderiam ser ingeridas "in natura".

No Brasil, Wesolowski e colaboradores (2007), em seus achados de amidos em cálculos dentários humanos de sambaquis, observaram grande ocorrência de grânulos de amido de *Dioscorea* sp no sambaqui de Morro do Ouro, localizado no estado de Santa Catarina onde já havia sido descrita frequência elevada de cáries. A maior frequência de cáries registrada entre os indivíduos sepultados neste sambaqui, quando comparada a de outras séries, parece ter associação ao achado de *Dioscorea* sp., pois o amido daquele vegetal possui características que lhe conferem maior adesividade, fixando o resíduo daquele alimento à superfície dental, dificultando a limpeza naturalmente feita pela mastigação e pela saliva e funcionando como substrato de carboidrato para a ação digestiva das bactérias. Esta hipótese de que haveria relação entre a maior ocorrência de grânulos de *Dioscorea* sp. e o alto índice de cárie naquele grupo pré-histórico seria ainda um indício da prática inicial de horticultura ou, pelo menos, do manejo de formas selvagens deste vegetal. Já em outros sítios do mesmo tipo sambaqui, localizados também em Santa Catarina, os mesmos autores observaram maior variabilidade de tipos de amido associada à menor frequência de cáries, sugerindo que os indivíduos que não especializaram sua dieta em *Dioscorea* sp., valendo-se de uma diversidade de vegetais coletados em seu ambiente, teriam ficado menos suscetíveis àquela doença dentária.

No mesmo estudo, os achados de carvão e areia contidos também nos cálculos, sugerem que a cocção dos alimentos poderia ter sido feita em contato com o carvão das fogueiras e com o solo, como quando o alimento é preparado em fornos escavados no chão, por exemplo. Esses mesmos microvestígios de carvão e minerais, além de ossículos de peixes e outros resíduos duros que costumam estar presentes na dieta dos povos costeiros, teriam contribuído para os fortes desgastes dentários encontrados nos indivíduos (WESOLOWSKI et al., 2007).

Apesar do pequeno número de estudos sobre amido em cálculos dentários, o protocolo de extração e de análise de microvestígios para cálculos dentários já apresenta algumas variações. À medida que os estudos são realizados, novos problemas e inovações são propostas e dificuldades superadas. Desafios como o da identificação dos amidos processados e o da quantificação dos microvestígios tem sido preocupação dos pesquisadores em seus trabalhos.

Fox; Juan e Albert (1996); Middleton (1990, 1994); Reinhard e colaboradores (2001); Walshaw (1999) basearam seus protocolos para extração e análise de microvestígios retidos em cálculos dentários humanos no protocolo de (MIDDLETON, 1990, 1994), que por sua vez foi adaptado do protocolo de (ARMITAGE, 1975), ambos para extração de microrresíduos contidos em cálculos dentários de herbívoros. Estes se utilizam da digestão química da matriz do cálculo para liberação dos microvestígios. A utilização do ácido tem por objetivo liberar microvestígios incorporados na matriz de cálculos dentários, e parte do pressuposto que este procedimento não causaria dano significativo aos grãos de amido e eliminando por dissolução a matriz que, entre outros efeitos, poderia mascarar a presença do amido.

Apesar dos protocolos que utilizam ácido em seus procedimentos apresentarem pequenas variações entre eles, destaca-se em um deles a recomendação de adição de um marcador, os esporos de *Lycopodium clavatum*, que ao serem adicionados em uma quantidade conhecida, possibilitam o cálculo da concentração daqueles microvestígios em cada amostra, tornando possível uma comparação entre as diversas amostras estudadas (REINHARD et al., 2001).

O uso de esporos de licopódio nas preparações para o estudo quantitativo de microvestígios vegetais, como polens, em amostras arqueológicas, tem sido descrito na literatura como um método baseado na proporcionalidade (PEARSALL, 2000). A diluição de uma proporção conhecida do marcador em uma solução que contém microvestígios permitiria estimar indiretamente a concentração dos mesmos a partir da sua contagem nas lâminas, desde que assegurada a homogeneidade da preparação.

A replicação desta metodologia em diferentes partições de amostras, no entanto, levou a resultados aparentemente contraditórios (FIGUEIREDO; WESOLOWSKI; MENDONÇA DE SOUZA, 2013), o que aponta para uma possível variabilidade nas preparações com viés nos resultados, sugerindo a necessidade de reavaliação deste procedimento, melhores controles das preparações obtidas antes da sua montagem e aferição. Diferentes fatores

poderiam estar introduzindo vieses quantitativos, entre eles: calibração de pipetas, o volume pipetado de solução, os procedimentos de homogeneização, o lapso de tempo entre o processamento da amostra e o preparo das lâminas, etc., o que deverá ser objeto de experimentações futuras.

Com base na contagem de Licopódio, entretanto, alguns trabalhos anteriores estimaram a concentração de grãos de amido nas amostras processadas, na tentativa de relacionar a quantidade de amido ingerida com o desenvolvimento da cárie dentária (REINHARD et al., 2001; WESOLOWSKI et al., 2007). Entretanto, questiona-se se é realmente possível estimar um maior ou menor consumo de vegetais baseado em uma maior ou menor concentração de grãos de amido no cálculo dental, desde que é sabido haver variação fisiológica em processos de formação de cálculos, além dos cálculos não representarem a acumulação de toda a alimentação de um indivíduo ao longo de sua vida. Isto torna o quantitativo de amido em uma amostra de cálculo, ou mesmo no cálculo total, um dado variável e circunstancial.

Outro complicador nesta metodologia é que o processamento de cálculo dentário utiliza volumes muito pequenos, em contraste com os maiores volumes utilizados para análise de outros microvestígios como pólen. Por esta razão, a aplicação do marcador, que funciona bem em certas análises, parece mostrar-se mais sujeita a erros no caso do amido dentário, onde a influência de quaisquer desses fatores acima mencionados pode ser consideravelmente mais elevada, em face da exigüidade dos microvestígios preservados e o pequeno volume de amostra de cálculo que pode ser processada, o que explicaria as contradições observadas ao se repetir as análises para amido.

Embora trabalhos venham sendo realizados há mais de duas décadas, investigações experimentais ainda são necessárias antes que se possa propor o melhor método para a análise quantitativa do amido arqueológico no cálculo dentário, os modos de quantificar os resultados e a confiabilidade de sua abordagem.

2.3. AMIDO MODIFICADO: DESAFIOS DE SUA IDENTIFICAÇÃO

A tecnologia do processamento de alimentos por povos antigos é uma parte importante do conhecimento sobre as maneiras como os humanos utilizavam e manejavam os recursos vegetais na pré-história, tendo relação, inclusive, com o rendimento e o aproveitamento dos alimentos. A interpretação de grânulos de amido modificados encontrados em diversos depósitos arqueológicos permite aos pesquisadores reconstruir também técnicas de processamento de plantas empregadas no passado, assim como diferenciar variações no uso dos alimentos por diferentes grupos humanos desaparecidos (BABOT, 2006).

Além do aquecimento, outros tipos de processamento também podem alterar os grânulos. Estes diversos processamentos provocam alterações de diferentes intensidades nas características morfológicas dos amidos, o que pode dificultar, ou mesmo impedir a identificação dos mesmos em contextos arqueológicos. Por esta razão é necessária também a identificação das alterações na morfologia dos grânulos após diferentes tipos de processamento, de modo a auxiliar a identificação dos achados arqueológicos. Este tipo de pesquisa vem sendo feita em alguns trabalhos (BABOT, 2003; FIGUEIREDO, 2012; HENRY; HUDSON; PIPERNO, 2009; MESSNER; SCHINDLER, 2010; ROBERTSON, 2006; TORRENCE; BARTON, 2006).

Entre os relatos de experimentos sobre as modificações ocorridas nos amidos depois de diferentes tipos de processamentos está o trabalho de Babot (2003) que examinou o impacto de algumas técnicas de processamento tradicionais andinas na preservação e cocção de vegetais amiláceos. Entre as plantas utilizadas estavam milho (*Zea Mays* L.), amaranto (*Amaranthus mantegazzianus* Passer. e *Amaranthus caudatus* L.) quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), batatas (*Solanum tuberosum* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Um dos procedimentos experimentais utilizados foi a desidratação e reidratação dos grânulos de amido de todos os vegetais relacionados acima. Em todos os casos, após esse tipo de processamento apenas uma pequena quantidade de grânulos apresentaram modificações na morfologia e na birrefringência, mas a quantidade e variedade de alterações foi proporcional à intensidade da desidratação. Os grânulos desidratados de amido de batata não apresentaram as lamelas características de grânulos de batata sem processamento. Alguns grânulos de feijão, milho e batata apresentaram maior número das pequenas fissuras normalmente presentes, além de apresentarem uma pequena abertura no hilo com fissuras relacionadas. Devido aos

grânulos de quinoa e amaranto serem extremamente pequenos o autor não descreve estas modificações nos mesmos.

Outro tipo de processamento usado por Babot (2003) foi a torrefação das amostras. Nas amostras de milho foram encontrados grânulos de amido intactos, alguns com a aparência achatada e alguns com a aparência de grânulos desidratados. Alguns se mostraram com uma fraca birrefringência ou com danos parciais à cruz de polarização. Muitos grãos pareceram estar gelatinizados e uma característica importante nestes grânulos foi a ocorrência de projeções arredondadas, irregulares ou em forma de estrela do hilo, que apareciam como partes escuras no centro dos grânulos. Nos grânulos de amido de quinoa, os únicos danos encontrados foram alterações na forma da cruz de polarização, uma leve gelatinização e a formação de aglomerados de grânulos compostos.

Outro tipo de teste foi feito pela mesma autora com a desidratação por congelamento, um tratamento típico dos Andes que produz o chamado *chuño de papa*, ou de batata. Os resultados mostraram grânulos achatados, sem lamelas visíveis e muitos grânulos perderam sua birrefringência, não sendo mais possível visualizar sua cruz de polarização, que quando visível estava deformada. E em todos os casos, os grânulos maiores parecem ter sido mais danificados do que os menores.

Loy (1994) refere que uma simples desidratação dos grânulos de amido pode causar a redução da birrefringência ou desaparecimento da cruz de polarização dos mesmos, mas esta pode voltar a aparecer após sua reidratação, mas este fenômeno foi raramente encontrado no estudo de Babot (2003).

Henry, Hudson e Piperno (2009) realizaram um extenso trabalho experimental sobre alterações de grânulos de amido de trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), aveia (*Avena sterilis* L.), milheto (*Panicum miliaceum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), arroz (*Oryza sativa* L.), lentilha (*Lens culinaris* Medik.), grão de bico (*Cicer arietinum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), e feijão (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), submetidos a diversos tipos de processamentos como fermentação, cocção em água fervente, cocção em forno, aquecimento (sem água) em alta temperatura em forno mufla e um processo de aquecimento em panela de aço com tampa fechada colocada em cima de uma chapa elétrica até que o pericarpo fosse rompido e o endosperma amiláceo visualizado. Os resultados mostraram que quanto maior o tempo de cocção, mais as características dos grânulos foram perdidas, até que ao atingir a completa gelatinização os mesmos tornam-se

irreconhecíveis. Grânulos compostos, quando inchados, perderam a forma multifacetada comum neste tipo de grânulo, e os grânulos simples tomaram formas irregulares e enrugadas ao incharem. Grânulos de amostras que foram moídas apresentaram mais alterações em menor tempo de cocção do que grânulos de amostras que passaram inteiras pelos procedimentos, mostrando que os grânulos do centro das amostras estariam protegidos durante o processamento.

Danos à cruz de polarização se mostraram bons indicadores de que o alimento tivesse passado por algum tipo de cocção, pois alguns grânulos que passaram por este processo se apresentaram sem alterações em luz transmitida, muito embora tivessem danos à cruz de polarização. Também foi observado que em todas as amostras, exceto as fervidas por 60min, e algumas das assadas, os grânulos de amido permaneceram reconhecíveis como amido, mesmo depois de intensas alterações. Em algumas amostras fervidas por menos de 10min, de 25-50% dos grânulos se preservaram ao ponto de poderem ainda ser taxonomicamente identificados, esse padrão se confirmou particularmente em amostras inteiras.

Como resultado final do estudo de Henry, Hudson e Piperno (2009), poucas alterações puderam ser associadas a técnicas específicas de cocção. Uma associação encontrada foi a alteração que ocorreu nos grânulos fermentados, cujas superfícies apresentaram áreas que pareciam escavadas ou faltando. Com base em outros estudos de fermentação, estas áreas foram interpretadas como os locais onde as leveduras teriam atacado e destruído o amido. O trabalho mostra que, mesmo que o método de processamento não possa ser identificado, é possível identificar quando o alimento passou por algum tipo de processamento.

Em trabalho que precedeu esta dissertação (Figueiredo, 2012), foi realizado um experimento para testar e descrever modificações de grãos de amido extraídos de vegetais domésticos modernos como o inhame, batata-doce e batata inglesa em uso comercial no Rio de Janeiro, sem especificação de espécie. Todas as fontes botânicas foram submetidas à secagem em estufa, cocção em forno convencional, e cocção em água em ebulição. No processo de secagem em estufa em baixa temperatura, nenhum dos grânulos de amido de todos os tubérculos e raízes testados apresentaram alterações em sua morfologia ou tamanho, se mostrando intactos quando submetidos a este processo. Já na cocção por forno convencional, foram observadas as seguintes alterações no amido da batata inglesa: um aumento de 2x no tamanho dos grânulos do amido, perda parcial da birrefringência, perda de sua forma característica, estrias no corpo de alguns grânulos, rachadura central iniciada no

hilo e ruptura. Todas essas alterações foram percebidas em diferentes tempos de processamento, sendo mais observadas nos tempos mais longos. Nos primeiros 5 minutos nenhuma destas alterações foi notada. Já o inhame apresentou amido mais resistente, pois as amostras coccionadas por 5 e 10 minutos não mostraram modificações na estrutura ou tamanho dos grânulos. Aos 20 e 30 minutos ocorreram modificações na estrutura do grânulo e pouquíssima alteração no tamanho dos mesmos. As modificações observadas foram um pequeno aumento de tamanho dos grânulos, a perda parcial ou total da birrefringência, ruptura de alguns grânulos e algumas estrias e dobras no corpo dos mesmos; sua forma característica foi pouco comprometida. Assim como descrito para a batata inglesa, o que diferiu em relação aos tempos de cocção foi a maior frequência das mudanças na cocção mais prolongada. Nos primeiros 5 minutos de cocção da batata-doce não puderam ser observadas alterações no tamanho ou na morfologia dos grãos. Aos 10 minutos, embora alguns grânulos já não possuíssem mais sua forma característica, permaneciam com as mesmas dimensões. Após 20 e 30 minutos ocorreu a perda parcial ou total da birrefringência, ruptura de alguns grânulos e algumas estrias no corpo dos mesmos. Na cocção em água em ebulição, os grânulos de todas as fontes botânicas aumentaram de tamanho em cerca de 10x, perderam completamente sua característica de birrefringência, sua forma, hilo e lamelas, ou seja, todas as características diagnósticas de um grânulo de amido, assim como a perda da textura da observada anteriormente.

Ainda existem poucas descrições da morfologia dos grânulos de amido que passaram por processamento. Há necessidade de experimentar mais para tentar definir melhor os processamentos pelos quais os grânulos passaram. Por outro lado, buscar possibilidades de identificação para confirmar a natureza amilácea do material quando o grânulo se torna uma massa amorfa, sem suas características diagnósticas como a cruz de polarização e lamelas, podendo então passar despercebidos.

O processamento térmico do amido faz com que suas cadeias de hidrogênio se rompam, permitindo assim que a água seja absorvida pelos grânulos, causando inchamento e outras mudanças nas características dos grânulos (CHIU; SOLAREK, 2009). Devido a esta quebra das ligações, além da água, também se torna possível que os grânulos absorvam certos corantes, como o corante vermelho congo, que parece reagir com a amilose exposta quando os grânulos estão danificados. Isto não acontece com grânulos intactos, que são hidrofóbicos (LAMB; LOY, 2005; WESTON, 2009), e desse modo é possível ajudar a identificar o amido processado. O vermelho congo é um corante solúvel em água que depende de ligações

lineares de hidrogênio para ser absorvido. Estudos já confirmaram seu uso para tingir celulose, fibrilas amilóides e produtos amiláceos agrícolas (CHOU; TSAI; LO, 2001; CONN; LILLIE, 1969; RAMESH; THARANATHAN, 1999). O corante só consegue tingir fibrilas amilóides em pH ácido, sendo assim, em pH neutro somente a celulose e o amido podem ser corados com o mesmo (CONN; LILLIE, 1969; CORTELLA; POCHETTINO, 1994; LOY, 1994; MEHTA; RAJPUT, 1998). Como as estruturas da celulose e o grânulo de amido são bem diferentes, não há como confundi-los ao serem encontrados em uma solução. Lamb e Loy (2005) propuseram protocolo do vermelho congo para coloração de grânulos de amido extraídos de artefatos. Apesar do protocolo descrito no trabalho de Lamb e Loy (2005) ter sido proposto para a remoção e tingimento de resíduos arqueológicos de amido provenientes de artefatos, tal processo parece poder ser adaptado aos resíduos oriundos de cálculos dentários, já que no protocolo preconizado por Lamb e Loy os resíduos contidos nos artefatos devem ser preparados em lâminas cobertas com lamínulas, e só depois deste procedimento o corante é aplicado. Muito embora tal adaptação tenha sido encontrada na literatura, o aperfeiçoamento de protocolos como este deverá permitir melhor identificação futura de resíduos de amido modificado também em cálculos dentários.

2.4. SAÚDE BUCAL X ALIMENTAÇÃO

Na cavidade oral, têm sido encontradas mais de 700 espécies ou filotipos de bactérias (AAS et al., 2005), mas muito ainda tem-se a descobrir sobre a microbiota da vacidade oral saudável (PASTER et al., 2001). Como uma característica positiva da nossa microbiota saudável, algumas espécies de bactérias são consideradas comensais, porém existem também as chamadas patogênicas. A cavidade oral funciona como um ambiente ecológico, devido a presença de diferentes microorganismos que compõem a microbiota oral, fazendo com que ao longo da vida, relacionado aos hábitos e tipos de exposição ocorridas, em função da idade, susceptibilidade, contágios, etc, esta microbiota produza condições que podem ser mais ou menos favoráveis à cárie e outras enfermidades da cavidade bucal (AAS et al., 2005).

Entre os fatores externos que modificam ou favorecem a microbiota bucal ao desenvolvimento de patologias dentárias está a alimentação, se mostrando um fator de grande

importância para dois agravos que mais possuem relevância no presente trabalho, a cárie (JENSEN, 1999) e o cálculo dentário (LIEVERSE, 1999).

A cárie é uma doença multifatorial, cujos principais fatores envolvidos são a microbiota cariogênica, a susceptibilidade do hospedeiro e a dieta. A interação entre esses três fatores e o tempo de interação entre os mesmos resulta no aparecimento da doença (LOESCHE, 1986; OLIVEIRA LIMA, 2007; PEREIRA et al., 2010).

O desenvolvimento da cárie somente ocorre na presença de microrganismos na superfície dental, contudo, a simples presença destes não é suficiente para o desenvolvimento da doença (PERINETTI et al., 2005). Há certa controvérsia sobre o papel das bactérias no processo de aparecimento da cárie por existirem duas abordagens teóricas diferentes. Estas abordagens se diferem pelos conceitos de agente espécie-específico, referente ao complexo *Streptococcus mutans* (LOESCHE, 1986), e o conceito de agente composto, referente à presença de microbiota bacteriana acidogênica e acidúrica composta (KLEINBERG, 2002).

O complexo *S. mutans* está bem definido referindo-se aos “Estreptococos do Grupo Mutans”, ou EGM, composto por sete espécies das quais, entretanto, apenas duas espécies, a *S. mutans* e *S. sobrinus*, apresentam potencial cariogênico em humanos. Os EGM são um grupo de microrganismos altamente cariogênicos com alta capacidade de colonizar a superfície dentária (FLORIO et al., 2004). São fermentadores ativos de carboidratos, possuem alta produção de polissacarídeos extracelulares do tipo glicanas favorecendo a formação de biofilme (SHKLAIR et al., 1979), possuem alta capacidade acidogênica e acidúrica, caracterizando-se como microorganismos desmineralizantes de esmalte e sobreviventes ao pH ácido (MENAKER; MORHART; NAVIA, 1986). Além disso, acumulam grandes quantidades de polissacarídeos intracelulares de glicose que serão metabolizados quando os açúcares exógenos estiverem esgotados, resultando na formação de ácido lático.

O conceito de agente cariogênico composto proposto por Kleinberg (2002) propõe que não necessariamente o *S. mutans* seja o agente específico responsável pela cárie, mas sim outras bactérias acidófilas cujo conjunto encontre-se presente na flora bacteriana oral. O autor argumenta que a presença massiva de *S. mutans* nos processos cariogênicos pode ser considerado mais associativa do que causal (Sims, 1985), visto que esta bactéria se adapta bem em um ambiente de pH ácido rico em açúcares, além de que a cárie pode se desenvolver sem sua presença.

A suscetibilidade do hospedeiro é outro fator importante para o surgimento de cáries principalmente quanto ao fluxo salivar e a composição da saliva. Qualquer problema nestes mecanismos resulta numa possibilidade maior do hospedeiro desenvolver cárie, porque a ação de lavagem mecânica da saliva é um mecanismo muito eficiente na remoção de resíduos alimentares e microorganismos orais não aderidos. Ainda, a saliva possui eficiente capacidade tamponante que tende a neutralizar os ácidos produzidos pelas bactérias do biofilme na superfície dos dentes, sendo ainda supersaturada com íons cálcio e fósforo, importantes na remineralização das lesões de mancha branca. A saliva também atua como veículo de distribuição de flúor (SAMARANAYAKE, 2013).

Muitas bactérias do biofilme utilizam açúcares presentes na dieta (sacarose, glicose, frutose e lactose) para seu metabolismo energético. A cárie dentária é uma doença alimentar-bacteriana e a sacarose é considerada como sendo o carboidrato mais cariogênico porque além da fermentação, é igualmente transformado em polissacarídeo extracelular na placa dentária. A presença destes polissacarídeos no biofilme aumenta também a porosidade da matriz da placa dentária, aumentando a cariogenicidade da sacarose (CURY et al., 2003).

As propriedades de uma dieta ou de um alimento podem provocar a cárie. A cariogenicidade de um alimento varia, dependendo da forma na qual ele é encontrado, da composição de nutrientes, de quando ele é consumido com relação a outros alimentos e líquidos, da duração de sua exposição ao dente e da frequência com que é consumido. As características físicas dos alimentos e sua consistência também devem ser levadas em conta. Um alimento açucarado pegajoso é mais difícil de ser removido e vai ficar mais tempo em contato com a superfície do dente (FEIJÓ; IWASAKI, 2014).

Os amidos são carboidratos contidos em alimentos cuja adesividade ao dente varia. Podem ser hidrolisados por amilases salivares e bacterianas, transformando-se em maltose, maltotriose e dextrinas de peso molecular baixo (MÖRMANN; MÜHLEMANN, 1981). A hidrólise do amido nas superfícies dos dentes é iniciada rapidamente após a entrada do alimento na boca, e partículas de comida aprisionadas podem acumular níveis elevados de maltose e maltotriose, que são bons substratos para a produção de ácido pelas bactérias (IMFELD, 1983; KASHKET; YASKELL; MURPHY, 1994; KASHKET; ZHANG; VAN HOUTE, 1996; NEFF, 1967).

A fermentação de maltose requer adaptação bacteriana sob certas condições (KASHKET; YASKELL; MURPHY, 1994), entretanto nos seres humanos a placa bacteriana

parece estar adaptada e pode fermentar esse açúcar sem demora (IMFELD, 1983; LINGSTRÖM et al., 1993; NEFF, 1967).

De Stoppelaar; Van Houte; Backer Dirks (1970) estudaram a influência da restrição de carboidratos na ocorrência das bactérias *S. mutans*, *S. sanguis* e da produtora de polissacarídeos *S. iodophilic*. Seis indivíduos foram privados de carboidratos por 17 dias e os níveis de estreptococcus dos três tipos foram comparados antes e depois da restrição do componente na dieta. Foi constatada a diminuição da porcentagem de *S. mutans* a um nível muito baixo ou indetectável. Simultaneamente a porcentagem de *S. sanguis* aumentou. A porcentagem de *S. iodophilic* também foi baixa durante este período. Este estudo demonstra o grande papel dos carboidratos na modulação do processo cariogênico.

A placa dentária é composta principalmente por algumas espécies de microorganismos da microbiota oral que aderem e se reproduzem na película de glicoproteínas salivares, formando um filme que reveste todas as superfícies dentárias expostas ao ambiente bucal (ROSAN; LAMONT, 2000). A placa é constituída por estreptococos de várias espécies, e ainda lactobacilos e bacilos gram-positivos e gram-negativos, além de organismos filamentosos em menor frequência. A placa dentária tem sido encontrada tanto em indivíduos positivos ou negativos quanto à presença de cárie (NYVAD; KILIAN, 1990; SILVA et al., 2008; SCHIEE, 1994).

O cálculo dentário é o resultado da mineralização da placa dentária, que ocorre pela deposição de sais de cálcio e fosfato no interior da matriz orgânica da placa. A formação do cálculo é dependente da formação da placa dentária, e facilitada pelo pH alcalino que aumenta a precipitação de cálcio e fosfato (COSTERTON et al., 1995; JIN; YIP, 2002; KOLENBRANDER, 2000; LIEVERSE, 1999) SCHIEE 1994;

A formação do cálculo dentário pode ser intensificada pelo aumento de concentração de uréia na saliva, pelo fato da mesma alcalinizar o pH bucal. O alto consumo de proteína pode levar a um aumento na formação de cálculos por dois mecanismos: aumentando a concentração de uréia no organismo e produzindo resíduos fibrosos que são retidos entre os dentes e quando decompostos continuam a produzir uréia por mais tempo. Assim, as dietas ricas em proteínas podem aumentar os níveis séricos de uréia, fazendo com que esses níveis também aumentem na saliva (ABDELLATIF; HEGAZY; EPSTEIN, MANDEL E SCOPP, 1980; CHOW; PETERSON, 1979; JIN; YIP, 2002; KLEINBERG, 2002; YOUSSEF, 2011).

Devido à relação entre o aumento do consumo de proteína e o aumento da formação

de cálculos dentários podemos entender a grande quantidade do volume dos depósitos de cálculos encontrados em indivíduos da cultura pré-histórica dos construtores de sambaqui, enquanto em outros tipos de sítios a quantidade de cálculos não é tão expressiva. Por serem sítios litorâneos, estes grupos teriam os peixes e moluscos como principais fontes de proteína, sendo encontrados em abundância, podendo então esta alimentação explicar o porquê da maior frequência de cálculos dentários em sítios deste tipo (SALLES CUNHA, 1963a).

2.5. SAMBAQUIS

Dentre os sítios arqueológicos pré-históricos mais numerosos e estudados do Brasil, estão os sambaquis. Descritos em geral com forma de meia-laranja, elevação de forma arredondada, podendo chegar até 30 metros de altura ou mais, são depósitos internacionalmente classificados como *mounds*. No Brasil são construídos geralmente com conchas marinhas, ossos de peixes e mamíferos, entre outros materiais remanescentes de práticas alimentares e rituais, por grupos de pescadores e coletores que ocuparam a faixa litorânea. Em muitos destes sítios encontram-se áreas destinadas a rituais funerários, o que faz com que estejam hoje entre os sítios mais ricos em remanescentes humanos, contando centenas de esqueletos. São vistos hoje como construções monumentais intencionais tendo entre outras finalidades demarcar o território de grupos que seriam semi-sedentários e que já davam início ao manejo de plantas ricas em carboidratos, embora isto pareça ter ocorrido apenas em alguns pontos do território e em alguns momentos temporais específicos (FIGUTI, 1993; GASPAR, 1998; PROUS, 1991; REINHARD et al., 2001; SCHEEL-YBERT et al., 2003; WESOLOWSKI et al., 2007).

Quando os sambaquis começaram a ser estudados, uma questão difícil de ser estabelecida era se os mesmos teriam sido derivados de processos naturais ou artificiais. Assim, duas vertentes disputaram a explicação científica para seu aparecimento, uma "naturalista" e outra "artificialista". A primeira considerava que os sambaquis seriam resultados do recuo do mar e da ação do vento exercida sobre as conchas lançadas à praia. A presença de vestígios humanos, como objetos e esqueletos era dita como resultado de naufrágios. Já a vertente "artificialista" considerava que estes sítios teriam sido resultado da

ação humana, propondo diversas explicações para tal interpretação. Dentre estas explicações estava a de que o acúmulo de restos de comida teria ocorrido pelo acúmulo de restos descartados ao redor das áreas habitadas, como se fossem lixo. Após diversas pesquisas em vários sítios e a descoberta de diversos indícios de ocupação humana, a vertente naturalista foi perdendo sua força. Entretanto, até a década de 1940 ainda era questão de discussão entre alguns pesquisadores (GASPAR, 2004; GASPAR et al., 2008; GUIMARÃES, 2003).

Até os anos 1980, a maioria das informações publicadas sobre a saúde destes grupos era direcionada ao perfil paleodontológico, com destaque para a baixa frequência de cáries e intenso desgaste dentário. A presença frequente de cálculos dentários grandes também já era mencionada para as séries esqueléticas (SALLES CUNHA, 1963a, 1963b).

No início da década de 1990, o número de pesquisas dedicadas ao modo de vida destes povos pré-históricos especializados na economia costeira que colonizaram ou ocuparam o litoral brasileiro aumentaram. A respeito das possíveis mudanças e/ou diversidade na dieta daqueles povos, a princípio os estudos foram baseados apenas nos macrorrestos esqueléticos, e só se pôde sugerir a existência de uma transição da coleta de molusco para a pesca em alguns sítios, seguindo-se estudos zooarqueológicos mais especializados que diversificaram as interpretações mostrando a importância da pesca, em detrimento da coleta de moluscos, contrariando a aparência resultante do acúmulo de carapaças nos sítios (FIGUTI, 1993). Posteriormente, métodos mais modernos, principalmente baseados em isótopos radioativos (COLONESE et al., 2014) confirmaram que a pesca sempre foi uma importante atividade de subsistência para estes povos, ainda que os restos e vestígios deixados por ela fossem menores do que enormes amontoados de conchas que resultavam das coletas de moluscos (GASPAR, 2004; GASPAR et al., 2008).

Entretanto, o grande acúmulo de restos esqueléticos nunca pode ser totalmente associado à dieta cotidiana, ainda que a sua dieta tivesse um forte componente protéico de origem animal. Hoje admite-se que parte dos achados faunísticos nos sambaquis possa representar principalmente atividades de festins funerários ou comida ritual, já que os dados paleonutricionais permitiram analisar marcadores como os isótopos de nitrogênio e carbono, confirmando sua escolha alimentar (BASTOS, 2009; COLONESE et al., 2014). No entanto, pouco se pode investigar sobre os alimentos de origem vegetal utilizados por estes grupos, inclusive pela dificuldade de separar, do ponto de vista bioquímico, indicadores de tal uso.

A parte vegetal da dieta destes grupos teve seu estudo menos destacado pela dificuldade em se encontrar evidência do uso direto de plantas. Devido a dificuldade de sua preservação em ambiente tropical úmido e sítios abertos, os achados se restringiam em geral a coquinhos comestíveis queimados, admitindo-se, entretanto que seu uso pudesse ter sido apenas como combustível e ritual.

Entre as evidências indiretas do possível uso de vegetais na alimentação, alguns objetos encontrados nos sítios foram atribuídos à preparação dos alimentos (KNEIP, 1977, 1994; TENÓRIO, 1991; GASPAR, 1995), foram valorizados, mas não foram comprovadamente portadores de evidências da dieta. Achados das primeiras sementes de plantas que produzem órgãos comestíveis, em sambaqui, foram feitas nos estudos antracológicos por Scheel-Ybert (2001).

Mesmo com a dificuldade de preservação de restos vegetais em sambaquis, algumas pesquisas avançaram em diferentes técnicas e métodos para resgatar mais informações sobre a parte vegetal da dieta destes povos, aplicando técnicas utilizadas em outros tipos de sítios e materiais arqueológicos. Entre estes se encontram as técnicas para recuperar microvestígios de amidos e fitólitos que podem ser encontrados aprisionados em moedores de pedra, na matriz de cálculos dentários (BOYADJIAN, 2012; REINHARD et al., 2001; WESOLOWSKI et al., 2007), e algumas vezes em sedimentos (REINHARD; EGGERS, 2003).

2.5.1. O Sambaqui de Cabeçuda

Um dos maiores sítios do Brasil, o sambaqui de Cabeçuda, escavado entre 1950 e 1951 pelo pesquisador Luiz de Castro Faria, do Museu Nacional do Rio de Janeiro, está localizado entre as lagunas de Santo Antônio dos Anjos e Imaruí, no município de Laguna, estado de Santa Catarina (Castro Faria, 1955). Deste sambaqui foi recuperado um número significativo de esqueletos humanos, somando mais de uma centena de indivíduos, sendo uma das maiores coleções de remanescentes humanos pré-históricos litorâneos do Brasil. A coleção de Cabeçuda, sob guarda do Setor de Antropologia Biológica do Departamento de Antropologia do Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foi iniciada por Castro Faria, mas hoje é constituída também por esqueletos recuperados em 2011, por um

projeto coordenado por Rita Scheel-Ybert (Projeto: “Gente, plantas e bichos: uma investigação multidisciplinar sobre o ritual funerário em dois importantes sambaquis do sul de Santa Catarina (Jaboticabeira-II e Cabeçuda)”) do Museu Nacional. Além disso, mais esqueletos foram recuperados em uma escavação em 2012 coordenada por Deisi Scunderlick, da UNISUL.

A estrutura estratigráfica do sítio mostrava camadas alternadas do topo até a base, formado por conchas e ossos de peixes, provavelmente provenientes da laguna próxima ao sítio. Ossos de pequenos mamíferos e de aves também foram encontrados, além de carvão e pequenos blocos de granito e diabásio. Havia também muitos vestígios de fogo, fogueiras e fogões de pedras sugerindo a interpretação inicial de que houvesse uma ocupação e habitação humana prolongada neste sambaqui (Castro Faria, 1955). Foram encontrados na escavação inicial do sítio partes de artefatos para caça e pesca, tais como pontas em osso, arpões, e anzóis, além de objetos para moagem, quebra ou trituração tais como quebra-cocos, almofarizes e batedores, e grande blocos de pedra cortados em diabásio.

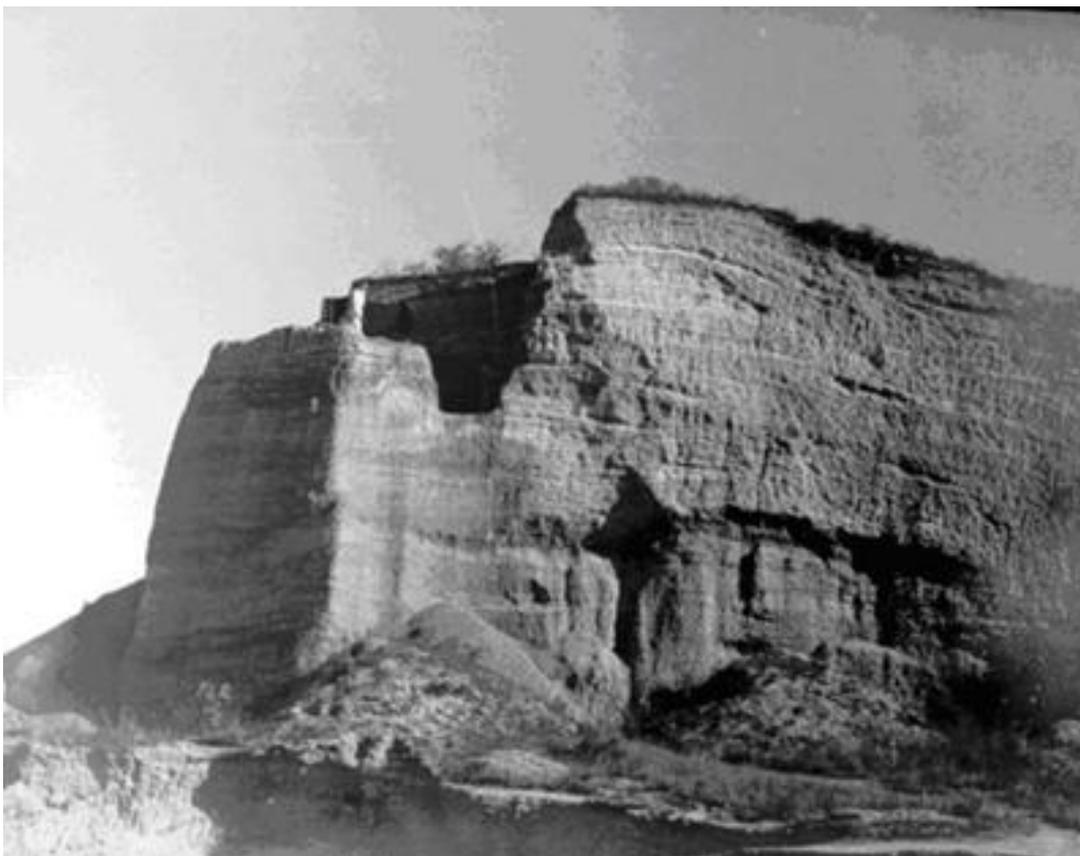


Figura 2. Vista do sambaqui de Cabeçuda (Fundo Castro Faria, Arquivo de História da Ciência, Museu de Astronomia/ MCT).

Dentre os resultados de estudos obtidos para este sítio destaca-se o trabalho de Salles Cunha, que na década de 60 documentou a ausência de cárie em 1329 dente

s provenientes do sambaqui de Cabeçuda. Em 1997, estudando as patologias e processos orais em esqueletos também do sítio de Cabeçuda, Rodrigues-Carvalho (1997) também relata ausência de cárie no material esquelético estudado, ressaltando, entretanto a grande formação de cálculos dentários.

Dentre as explicações para este índice de cárie nessas séries, Salles Cunha, (1963b) sugere uma resistência natural dos dentes daqueles povos a esta doença. Já Araújo (1970) estudando outros sítios do mesmo tipo, aborda a baixa frequência de cáries sugerindo que a alta ingestão de cálcio e vitaminas A e D, pela subsistência adaptada a ambientes costeiros, auxiliariam na prevenção desta enfermidade devido ao fortalecimento dos tecidos mineralizados que estes compostos promovem. Em estudo sistêmico sobre a saúde daquele grupo de Cabeçuda, Mendonça de Souza (1995) propõe uma interpretação mais ecológica, e sugere uma competição entre microorganismos devido ao favorecimento ou introdução de

outras espécies, como os vibriões de águas salinas, mudando a microbiota oral pela ausência de bactérias acidogênicas que seriam responsáveis pelo desenvolvimento da cárie.

Para explicar a ausência da cárie dentária foram sugeridos ainda, além do aporte protéico, de minerais e fósforo na dieta, a presença e a disponibilidade de vitamina D. Salles Cunha (1963b) lembra que as arcadas dentárias de Cabeçuda mostram formação de cálculo dental, por vezes exuberante, comprovando a formação de placas de resíduos alimentares, mas ressalta não ter havido proliferação bacteriana cariogênica. A esse respeito chega a ser considerado que as condições de ambiente bucal dos indivíduos não fossem propícias ao desenvolvimento de flora acidofílica.

A ausência total de cárie, entretanto, ainda não foi totalmente entendida ou explicada. Esse índice sugere uma dieta provavelmente reduzida em calorias provenientes de carboidratos fermentáveis, mas essa hipótese ainda não tinha sido testada o que motivou o presente trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é analisar cálculos dentários humanos provenientes do sambaqui de Cabeçuda, em busca de grânulos de amido oriundos da dieta de grupos humanos pré-históricos que ali sepultaram seus mortos, identificando-os, quando possível, a fim de propor hipóteses sobre o componente vegetal da dieta e correlacioná-lo com a ausência de cáries para o mesmo sítio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar presença ou ausência de grânulos de amido na matriz dos fragmentos de cálculos dentários coletados;
2. Identificar táxons vegetais a partir do amido recuperado nos cálculos dentários;
3. Identificar sinais de modificações no amido decorrente do seu processamento anterior à ingestão;
4. Propor interpretações sobre a saúde dentária e saúde geral dos grupos estudados considerando o componente de dieta vegetal e o processamento de alimentos;
5. Propor interpretações sobre a relação entre a saúde dentária destes grupos e o uso de vegetais disponíveis em seu ambiente natural e/ou introduzidos por práticas culturais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 25 fragmentos de cálculos dentários de dentes de indivíduos provenientes do sambaqui de Cabeçuda. O material está listado no Livro de Tombo do Setor de Antropologia Biológica do Museu Nacional do Rio de Janeiro, localizado na Quinta da Boa Vista, e pertencente à Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os dentes estudados são provenientes de esqueletos escavados por Castro Faria (1950) e apenas 3 esqueletos pertencentes à escavação de 2011 coordenada por Rita Scheel-Ybert (amostras 234, 235 e 236). Uma parte das amostras, apesar de proveniente do sítio, não tem indicação estratigráfica precisa.

A escolha de dentes da bateria mencionada deu-se pela maior acumulação de cálculos naqueles, proporcionando mais material para a análise, já que o presente estudo compartilhou as amostras de cálculos com outra dissertação (PESSANHA, 2015) feita na Escola Nacional de Saúde pública Sergio Arouca – FIOCRUZ. Tratando-se de estudos destrutivos das amostras, e por serem materiais raros e insubstituíveis, a orientação nas análises de material arqueológico busca sempre a abordagem mais conservadora possível.

As amostras foram processadas e analisadas em momentos diferentes, sendo estas divididas em duas séries: o primeiro grupo já havia sido processado durante a realização de uma primeira abordagem do material deste sítio, antes do mestrado, pela autora em 2012, englobando as amostras 234 a 244. Outra série de amostras do mesmo sítio foi processada e analisada em 2015 e 2016, durante o mestrado, englobando as amostras 268 a 281.

A metodologia do processamento das amostras difere-se de uma série para outra devido a ajustes feitos na mesma, estas serão sinalizadas no decorrer do texto.

Tabela 1. Identificação e localização dos indivíduos, características dos dentes e peso dos cálculos escolhidos.

Amostra	Indivíduo/n ° tombo	Dente	Peso Utilizado	Peso total	Quadra	Nível estratigráfico
234	Sep 4/-	1° Molar inferior esquerdo	0,0018g	0,0018g	-	-
235	Sep 3/-	2° molar superior esquerdo	0,0027g	0,0027g	-	-
236	Sep 1/-	1° molar superior esquerdo	0,0034g	0,0034g	-	-
237	-/ MN1674	2° Molar superior esquerdo	0,0004g	0,0004g	II B(A)	2,50m– 2,75m
238	-/ MN1673	2° Molar superior esquerdo	0,0030g	0,0030g	II B(C)	2,50m-2,75m
239	-/ MN1677	1° Molar inferior esquerdo	0,0027g	0,0027g	-	-
240	- / MN 1678	1° Molar inferior direito	0,0049g	0,0049g	-	-
241	- / MN 1840	2° Molar superior esquerdo	0,0111g	0,0111g	-	-
242	-/ MN1834	2° Molar superior esquerdo	0,0007g	0,0007g	-	-
243	-/ MN1825	1° Molar inferior esquerdo	0,0078g	0,0078g	-	-
244	-/ MN1828	1 Molar superior direito	0,0036g	0,0036g	-	-
268	-/1743	Molar superior direito	0,0044g	0,0068g	IV-F	4,00m-4,75m
269	-/1691	Molar superior direito	0,0212g	0,0245g	III-F	4,00m-4,25m
270	-/1920	Molar inferior direito	0,0026g	0,0042g	VII-G	6,00m-6,25m
271	-/1674	Molar inferior esquerdo	0,0038g	0,0068g	II B(A)	2,50m– 2,75m
272	-/1729	Molar inferior direito	0,0105g	0,0123g	V-A	1,50m-1,75m
273	-/1778	Molar superior direito	0,0041g	0,0057g	VII-H	6,00m-6,25m
274	-/1675	Molar inferior esquerdo	0,0022g	0,0072g	II-A	2,00m-2,25m
275	-/1918	Molar inferior direito	0,0012g	0,0056g	-	-
276	-/1924	Molar superior esquerdo	0,0060g	0,0083g	B	2,00m-2,75m
277	-/1771	Molar superior direito	0,0116g	0,0126g	VI-F	5,20m
278	-/1793	Molar superior direito	0,0004g	0,0016g	-	-
279	-/1916	Molar superior direito	0,001g	0,0031g	-	-
280	-/1796	Molar superior esquerdo	0,0005g	0,0021g	-	-
281	-/1753	Molar superior direito	0,0022g	0,0041g	-	-

4.1. ESCOLHA E RETIRADA DOS CÁLCULOS

Os dentes foram escolhidos com base nos seguintes critérios: dentes com presença de cálculos dentários de tamanho médio; facilidade de desarticulação do dente e retirada do cálculo; procedência confirmada do material pelo Livro de Tombo; menor quantidade de sedimento possível aderido ao dente.

Na primeira série de cálculos analisados e processados foram seguidos os procedimentos padronizados por Wesolowski (2007) para a retirada dos cálculos, registro das características dos mesmos, extração de microvestígios e análise microscópica dos microvestígios encontrados. Já na segunda série de cálculos, parte da fase de extração dos microvestígios e a montagem para exame microscópico foram adaptadas com variações das metodologias.

A retirada dos cálculos foi feita na instituição de origem do acervo (Museu Nacional/UFRJ) e de acordo com a prévia autorização de curadores, para evitar o traslado dos materiais arqueológicos. Devido às instalações do lugar de origem do acervo não apresentarem condições ideais para que não houvesse contaminação do material com microrresíduos modernos, algumas medidas preventivas foram tomadas.

Com portas e janelas fechadas, uma bancada da sala em que os dentes foram registrados e os cálculos retirados foi limpa com água e hipoclorito de sódio, com uso de esponja de espuma sintética, pois materiais como tecido e papel poderiam contaminar as amostras com fibras por conterem muito deste material. As amostras foram manipuladas apenas com luvas descartáveis de vinil sem talco.

Os dentes, ainda com os cálculos em sua situação original, foram fotografados. A seguir a superfície externa dos cálculos foi fotografada com lupa digital (Avantgarde®) com aumento de 100x. Foram feitos também registros da superfície oclusal do dente, do osso da mandíbula ou maxila (dependendo do dente escolhido), do limite entre o cálculo e a superfície de esmalte do dente (vestibular), e do limite do cálculo com a raiz de cada dente, na área do colo dentário.

Cada dente e respectivo cálculo foram limpos com água destilada, com auxílio de escovas interdentais macias e descartáveis. O procedimento se deu pela aplicação da escova molhada em água, em movimentos repetidos e direcionados na superfície a ser limpa, com

objetivo de remover o máximo dos sedimentos de solo que ficaram presos nos relevos e nos poros da superfície. O movimento repetiu-se até se obter uma superfície clara e sem resíduos visíveis a olho nu. Após a limpeza de cada dente a escova usada foi descartada, passando-se então a operação em outro dente. Após os procedimentos de limpeza, foram feitas novas fotografias com a mesma lupa digital, para confirmar a eficiência da limpeza, pois a presença de materiais aderidos poderia mascarar os resultados com microvestígios existentes na superfície das amostras.

Os cálculos foram então retirados dos dentes. Essa retirada foi feita mediante a aplicação de uma leve pressão com uma cureta odontológica no limite entre o cálculo e a raiz do dente, no sentido da coroa para a raiz; a remoção foi feita em cima de uma placa de Petri coberta com papel alumínio. Na primeira série de cálculos, cada cálculo foi pesado em balança digital SPLABOR e armazenado separadamente em eppendorf com capacidade para 1,5ml, devidamente identificado. Na segunda série, após pesado, uma partição de cada cálculo foi retirada para documentação dos microvestígios bacterianos nos mesmos (PESSANHA, 2015); o que restou foi novamente pesado e utilizado no presente trabalho.

4.2. PROCESSAMENTO DOS CÁLCULOS E MONTAGEM DAS LÂMINAS

Série 1

O processamento dos cálculos dentários ocorreu no Laboratório de Ecologia da ENSP. Para que não houvesse contaminação foi usada a capela do laboratório, após higienização com hipoclorito de sódio. Também para prevenir contaminação os reagentes utilizados foram novos, sendo abertos para este uso específico, assim como as pissetas. As provetas utilizadas foram limpas também com hipoclorito de sódio. Foram utilizadas luvas descartáveis de vinil sem pó, e nenhum outro material que não os cálculos foi manipulado no laboratório, durante seu processamento.

A dissolução das amostras ocorreu em duas etapas. Os cálculos foram separados em 2 lotes, sendo incluídos dois eppendorfs vazios (controle) para cada lote de cálculos analisados. A dissolução seguiu o protocolo de Wesolowski (2007). Neste primeiro experimento não foi registrada contaminação por amido moderno nos controles do laboratório, ainda que o mesmo

tenha ocorrido em outro momento de testagem do local. O processamento das amostras iniciou-se pela adição de um tablete de esporos de *Licopodio* a cada microtubo contendo uma amostra de cálculo dentário. A seguir foi acrescentado 1,5 ml de ácido clorídrico (HCl) a 10% a cada amostra de cálculo dentário, e também às amostras controle. As amostras permaneceram no HCl até a dissolução completa do cálculo. Na seqüência da dissolução as amostras foram centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Foi acrescentado 1,5ml de água destilada a cada amostra, que a seguir foram novamente centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos. Este procedimento foi repetido 2 vezes para que as amostras ficassem bem lavadas e o HCl fosse eliminado. Após a segunda lavagem com água destilada foi acrescentado 1,5ml de etanol PA (ETOH 100) a cada amostra, para desidratação. As amostras foram novamente centrifugadas a 1000 RPM, durante 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e as amostras foram padronizadas no volume de 0,5ml em cada microtubo.

Para a montagem das lâminas foi colocada uma gota de glicerol (50%) em cada lâmina e 10µl do material dissolvido no eppendorf foi então pipetado sobre a glicerina, coberto com lamínula e selado com Entellan®; sendo montada uma lâmina para cada cálculo.

Série 2

O processamento dos cálculos dentários passou a ser feito no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – FIOCRUZ. O local do processamento das amostras foi modificado depois que foi confirmada através de testes-controle a maior contaminação por amido no laboratório anteriormente utilizado. Para esta escolha foram testados três laboratórios: Laboratório de Ecologia da ENSP (onde o primeiro grupo de cálculos havia sido processado), o Laboratório de Paleoparasitologia da ENSP e o Laboratório de pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do INI - FIOCRUZ). Apesar de ter ocorrido contaminação por amido moderno em todos os ambientes, o laboratório escolhido para análise desta série de amostras foi o que apresentou menor contaminação durante os testes.

Para tentar prevenir uma possível contaminação do material processado foi usado o fluxo laminar do laboratório, limpo anteriormente com hipoclorito de sódio. Tal como nos experimentos anteriores os reagentes eram novos, e os demais materiais utilizados eram

estéreis, e além disso foram utilizadas luvas descartáveis de vinil sem pó, e nenhum outro material que não os cálculos foi manipulado no laboratório, durante seu processamento.

A dissolução das amostras ocorreu em duas etapas. Os cálculos foram separados em 2 lotes, sendo incluídos dois eppendorfs vazios (controle) para cada lote de cálculos analisados. A dissolução seguiu o protocolo de Wesolowski (2007). Sendo assim, o processamento das amostras iniciou-se pela adição de um tablete de esporos de *Licopodio* a cada microtubo contendo uma amostra de cálculo dentário. A seguir foi acrescentado 1,5 ml de ácido clorídrico (HCl) a 10% a cada amostra de cálculo dentário, e também às amostras controle. As amostras permaneceram no HCl até a dissolução completa do cálculo. Na seqüência da dissolução as amostras foram centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Foi acrescentado 1,5ml de água destilada a cada amostra, que a seguir foram novamente centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos. Este procedimento foi repetido 2 vezes para que as amostras ficassem bem lavadas e o HCl fosse eliminado. Após a segunda lavagem com água destilada foi acrescentado 1,5ml de etanol PA (ETOH 100) a cada amostra, para desidratação. As amostras foram novamente centrifugadas a 1000 RPM, durante 5 minutos e o sobrenadante retirado.

Para a montagem das lâminas foi feito outro ajuste da metodologia, visando examinar o volume total de cada amostra de cálculo processado. Todo o material restante no eppendorf após a retirada do sobrenadante foi montado, mantendo-se entretanto o padrão de 10 μ l por lâmina, coberto com lamínula e selado com esmalte, em substituição ao entelan, em falta no período no laboratório. A quantidade de lâminas por amostra variou devido ao tamanho do fragmento de cálculo utilizado (ver tabela 2, p.44) e conseqüentemente ao volume originalmente presente em cada microtubo. Essa variação ocorreu por conta do tamanho de cada cálculo, tendo os maiores cálculos, maior volume de amostra e conseqüentemente gerando maior quantidade de lâminas montadas, que variaram de 3 a 5 lâminas por amostra.

As lâminas das duas séries foram observadas em microscópio de luz transmitida e luz polarizada em aumento de 400x. O exame das lâminas começou sempre pelo canto superior esquerdo, observando-se até o final da linha, sempre para a direita. Ao final desta primeira linha, a lâmina era movida um campo e meio para baixo, e a observação prosseguia em sentido contrário. O processo era repetido até que toda a lâmina fosse examinada. Apenas amidos e esporos de *Licopodio* foram contados, fotografados e tiveram suas quantidades registradas em ficha desenvolvida para este fim.

5. RESULTADOS

O processamento dos cálculos ocorreu satisfatoriamente, os mesmos se dissolveram em um máximo uma hora e meia, havendo variação entre eles, mas aparentemente sem relação com o peso do cálculo. Os descartes foram sempre analisados não sendo encontrados esporos de Licopodio ou qualquer outro microvestígio que sugerisse ter ocorrido perda do material processado.

Em relação aos controles de contaminação por amido, tal como informado anteriormente, todas as lâminas feitas foram positivas, em ambas as séries. Este resultado, contrastando com o ocorrido na primeira etapa do estudo, manteve-se em diferentes dias, em que foram realizados testes anteriores ao processamento dos cálculos, repetindo-se todo o protocolo apenas em eppendorfs sem cálculos. Esta condição apontou para uma contaminação por amido atual persistente e de origem ambiental, que repetiu-se nos três laboratórios disponibilizados para o estudo, ainda que em maior ou menor quantidade.

Escolhido para processamento dos cálculos o laboratório que mostrava níveis mais baixos de contaminação, os cálculos foram processados, assumindo o valor máximo de grãos por lâmina contaminada naquele laboratório como o "nível zero" para contagem de amido nos cálculos processados.

Tabela 2. Contagem de grânulos de amido e Licopodio por lâmina analisada.

Indivíduo/n° tombo	Dente	Peso Utilizado	Peso total	Lâmina	Licopodio	Amido
<u>SÉRIE 1</u>						
Sep 4/-	1MIE	0,0018g	0,0018g	234 #1	210	1
				234 #2	133	0
Sep 3/-	2MSE	0,0027g	0,0027g	235 #1	63	0
				235 #2	112	0
Sep 1/-	1MSE	0,0034g	0,0034g	236 #1	163	0
				236 #2	59	1
MN1674	2MSE	0,0004g	0,0004g	237 #1	168	0
MN1673	2MSE	0,0030g	0,0030g	238 #1	158	0
				238 #2	140	1
MN1677	1MIE	0,0027g	0,0027g	239 #1	127	0
				239 #2	265	0

- / MN 1678	1MID	0,0049g	0,0049g	240 #1	138	1
				240 #2	89	1
- / MN 1840	2MSE	0,0111g	0,0111g	241 #1	144	0
				241 #2	87	1
MN1834	2MSE	0,0007g	0,0007g	242 #1	143	1
				242 #2	171	2
MN1825	1MIE	0,0078g	0,0078g	243 #1	137	0
MN1828	1MSD	0,0036g	0,0036g	244 #1	35	1
				244 #2	122	1
Controle 1	-	-	-	Controle1	142	1
Controle 2	-	-	-	Controle 2	186	2
Controle 3	-	-	-	Controle 3	201	1
Controle 4	-	-	-	Controle 4	169	1
<u>SÉRIE 2</u>						
-/1743	MSD	0,0044g	0,0068g	268#1	112	1
				268#2	99	1
				268#3	88	0
-/1691	MSD	0,0212g	0,0245g	269#1	400	0
				269#2	359	3
				269#3	230	0
-/1920	MID	0,0026g	0,0042g	270#1	227	1
				270#2	427	5
				270#3	186	1
-/1674	MIE	0,0038g	0,0068g	271#1	445	2
				271#2	205	2
-/1729	MID	0,0105g	0,0123g	272#1	15	0
				272#2	102	2
				272#3	77	0
				272#4	94	1
-/1778	MSD	0,0041g	0,0057g	273#1	12	0
				273#2	100	0
				273#3	115	0
-/1675	MIE	0,0022g	0,0072g	274#1	453	0
				274#2	354	2
				274#3	271	0
-/1918	MID	0,0012g	0,0056g	275#1	226	2
				275#2	407	2
-/1924	MSE	0,0060g	0,0083g	276#1	412	1
				276#2	292	0
				276#3	201	0
				276#4	117	0

				276#5	59	0
-/1771	MSD	0,0116g	0,0126g	277#1	1329	3
				277#2	383	0
-/1793	MSD	0,0004g	0,0016g	278#1	588	7
				278#2	478	0
				278#3	460	0
-/1916	MSD	0,001g	0,0031g	279#1	579	2
				279#2	428	0
				279#3	386	0
-/1796	MSE	0,0005g	0,0021g	280#1	301	3
				280#2	226	1
-/1753	MSD	0,0022g	0,0041g	281#1	337	1
				281#2	217	1
				281#3	118	0
Controle 1	-	-	-	C01#1	950	1
				C01#2	358	2
Controle 2	-	-	-	C02#1	764	2
				C02#2	406	3

Ao contrário do esperado a partir dos relatos da literatura para outros sambaquis brasileiros, os resultados dos cálculos processados para o Sambaqui de Cabeçuda mostraram um número extremamente baixo de grânulos de amido por lâmina analisada.

A Tabela 2 mostra os valores absolutos de grânulos de amido encontrados em cada lâmina, incluindo as lâminas de controle, onde os mesmos aparecem pela contaminação. Apenas em uma lâmina de cada uma das amostras #1920 (5 grãos por lâmina) e #1793 (7 grãos por lâmina) o número de grãos de amido contado foi superior ao máximo de grãos de amido (3 por lâmina) observado nos controles.

Foram encontrados grânulos de amido em 20 dos 25 cálculos analisados. Para 14 das amostras (segunda série de cálculos) o resultado expressa a análise do total de amido existente em cada amostra, diferente do realizado para a primeira série de cálculos no presente trabalho, e também para estudos anteriores publicados na literatura (WESOLOWSKI, 2007) para o Brasil, onde as lâminas foram montadas com apenas uma parcela da solução de cálculo, sendo observados e contados somente grânulos desta parcela da amostra. As 8 lâminas feitas para controle tiveram resultados positivos para grânulos de amido, em maior quantidade variável, mas não ultrapassando 3 grânulos por lâmina. Estimando-se grosseiramente uma quantidade de grânulos por microlitro tem-se nos controles da primeira série 0,12 grânulos/microlitro e

nos controles da segunda série 0,2 grânulos por microlitro. Já nas amostras de cálculo dentário, na primeira série a quantidade de grânulos por microlitros ficou em 0,05 grânulos/microlitro e nas amostras de cálculos dentários da segunda série foi de 0,1 grânulo/microlitro.

Diferentes tipos de grânulos foram encontrados, a maioria deles grânulos modificados apresentando rompimento do grânulo, rompimento do hilo, alterações na birrefringência e dobramentos nos grânulos. Um grânulo de amido é sugestivo de *Ipomoea batatas* (batata doce) por comparação com coleção de referência. Todos os outros não foram identificados. O número reduzido de observações torna difícil a comparação, mas aparentemente não houve especificidade na ocorrência de um ou outro tipo de amido em controles ou amostras.

Considerando-se o parâmetro adotado no presente estudo para interpretação dos resultados, os mesmos apontam para a ausência de amido na maior parte das lâminas preparadas com os cálculos dentários humanos provenientes do sambaqui de Cabeçuda, podendo admitir-se em duas lâminas representando dois diferentes indivíduos a presença de um pequeno número de grãos sugerindo achado positivo para este componente nutricional. Em ambos os casos que poderiam ser considerados positivos não foi possível identificar o taxon vegetal representado pelo amido presente.

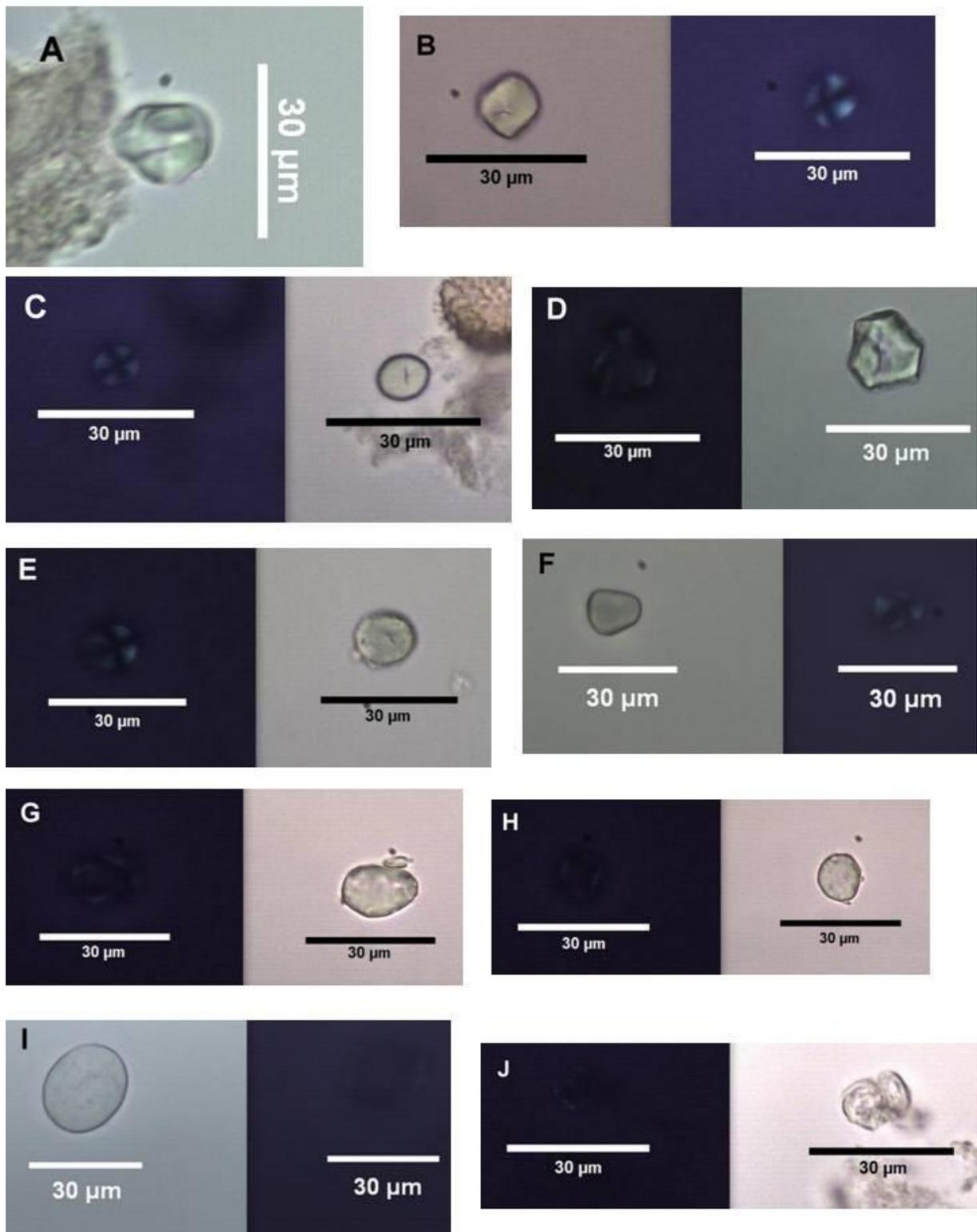


Figura 3. Grânulos de amido de cálculos dentários do sambaqui de Cabeçada, série 1. Aumento de 400x. A: Amostra 234#1, B Amostra 236#1, C: Amostra 238#1, D: Amostra 240#1, E: Amostra 240#2, F: Amostra 242#1, G: Amostra 242#2, H: Amostra 242#2 (2), I: Amostra 244#1, J: Amostra 244#2. Nenhum grânulo foi identificado.

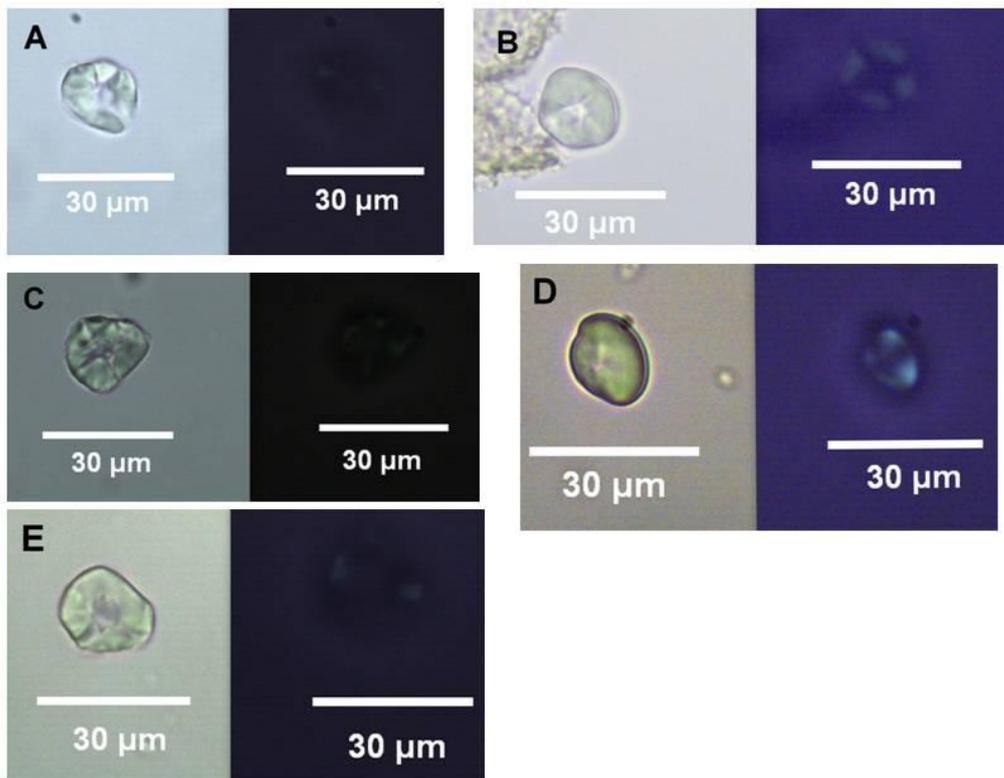


Figura 4. Grânulos de amido encontrados nas amostras controle da Série 1. Aumento de 400x.

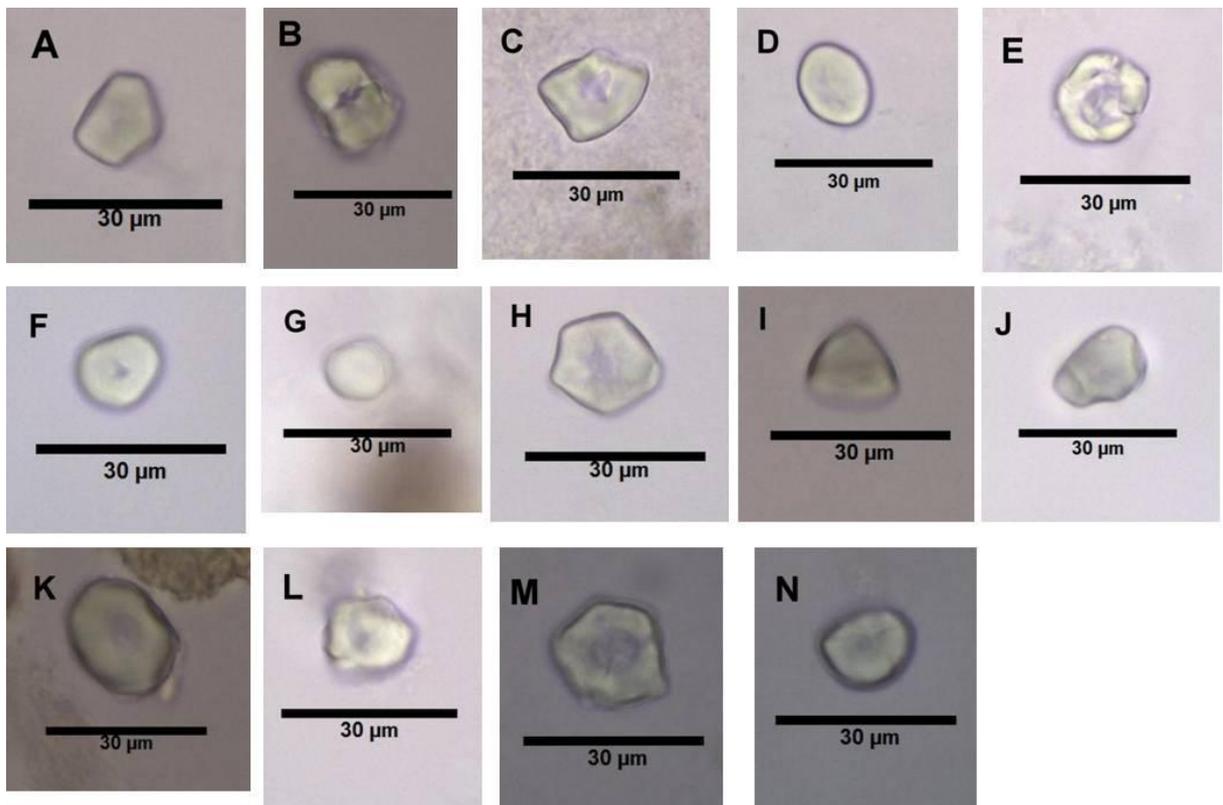


Figura 5. Grânulos de amido nos cálculos do sambaqui de Cabeçuda, série 2. Aumento de 400x. A: Amostra 268#1, B Amostra 268#2, C: Amostra 269#2, D: Amostra 269#2 (2), E: Amostra 269#2 (3), F: Amostra 270#1, G: Amostra 270#2, H: Amostra 270#2 (2) (2), I: Amostra 270#2(3), J: Amostra 270#2(4), K: Amostra 270#2 (5), L: Amostra 270#3. M: Amostra 271#1, N: Amostra 271#1 (2).

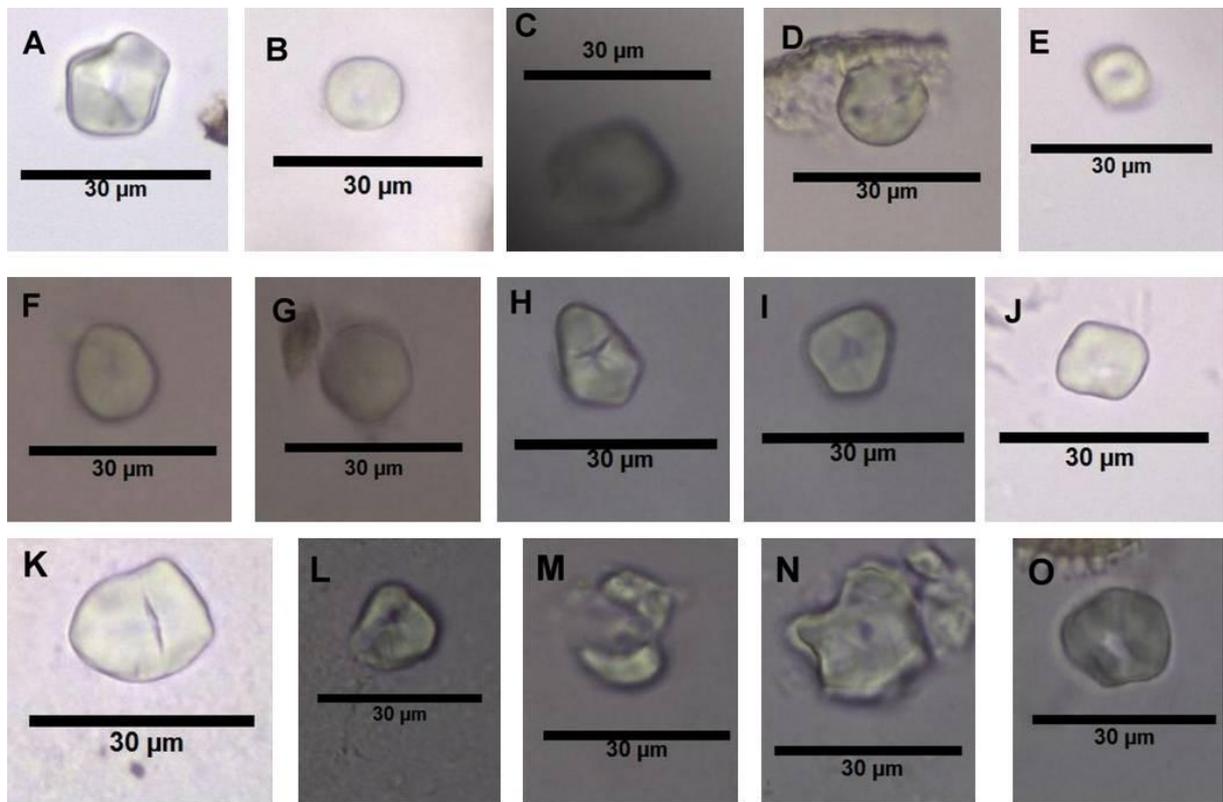


Figura 6. Grânulos de amido nos cálculos do sambaqui de Cabeçuda, série 2 (2). Aumento de 400x. A: Amostra 271#2, amido sugestivo de batata doce (modificado?) B Amostra 271#2 (2), C: Amostra 272#2, D: Amostra 272#2 (2), E: Amostra 272#4 (3), F: Amostra 274#2, G: Amostra 274#2 (2), H: Amostra 275#1, I: Amostra 275#1, J: Amostra 275#2, K: Amostra 275#2 (2), L: Amostra 276#1, M: Amostra 277 #1, N: Amostra 277 #1 (2), O: Amostra 277 #1 (3).

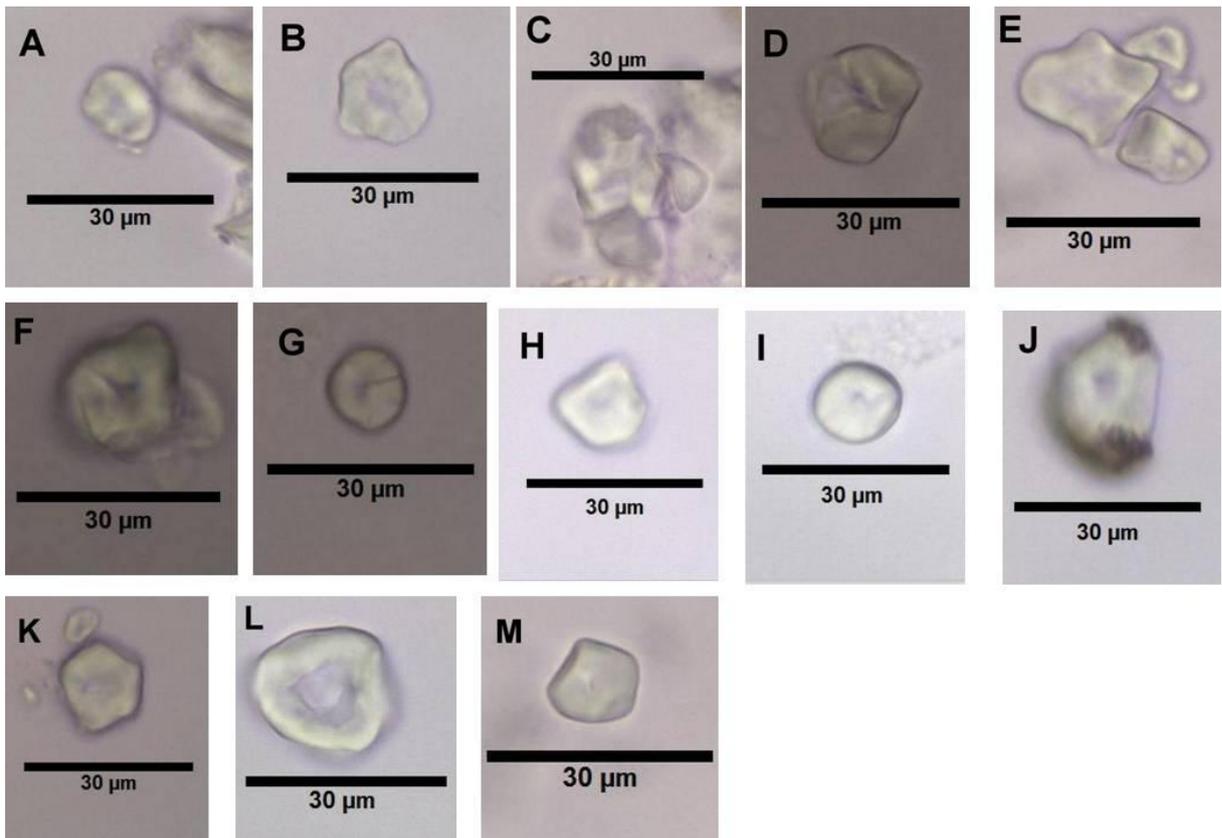


Figura 7. Grânulos de amido nos cálculos do sambaqui de Cabeçuda, série 2 (2). Aumento de 400x. A: Amostra 278#1, B Amostra 278#1 (2), C: Amostra 278#1 (3), D: Amostra 278#1 (4), E: Amostra 278#1 (5), F: Amostra 279#1, G: Amostra 279#1 (2), H: Amostra 280#1, I: Amostra 280#1 (2), J: Amostra 280#1 (3), K: Amostra 280#2, L: Amostra 281#1, M: Amostra 281 #2.

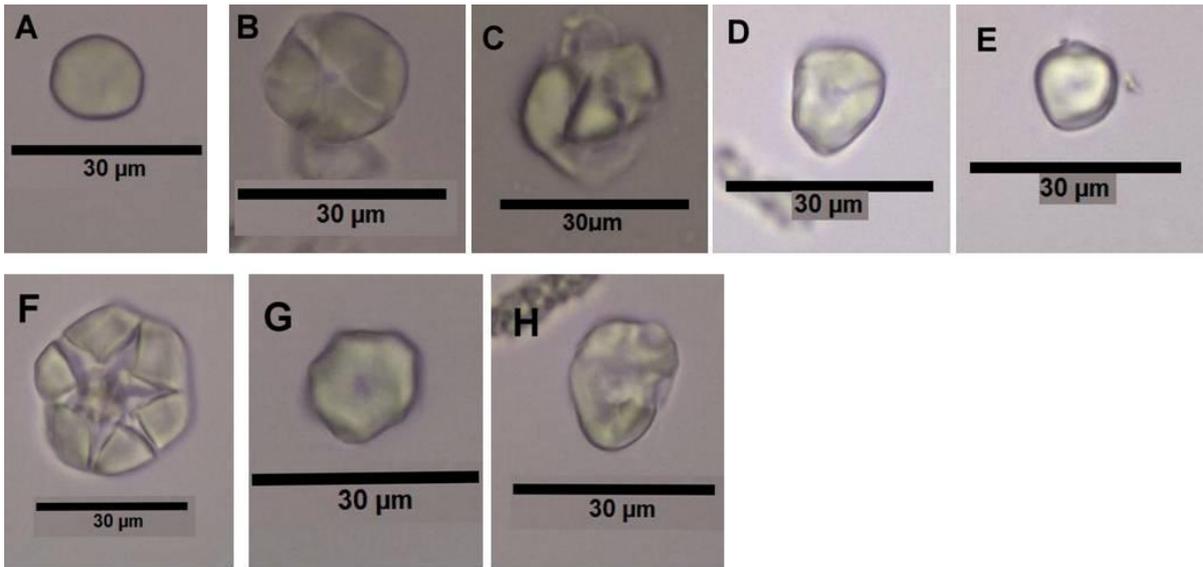


Figura 8. Grânulos de amido encontrados nas amostras controle da Série 1. Aumento de 400x.

6. DISCUSSÃO

6.1. QUESTÕES METODOLÓGICAS

A proposta de realizar este trabalho foi inicialmente motivada apenas pela necessidade de ampliar as amostras estudadas para o sambaqui de Cabeçada e confirmar a suspeita inicial de que naquele grupo muito pouco amido estava presente nos cálculos dentários, o que era coerente com a ausência de cáries pela qual o grupo tornou-se conhecido desde os primeiros estudos (SALLES CUNHA, 1963b). Na medida em que os experimentos em laboratório foram sendo desenvolvidos, entretanto, as questões metodológicas surgiram tornando necessários ajustes e levando a questionamento do que anteriormente vinha sendo feito. Deste modo a pesquisa desdobrou-se em ensaios e questões que, mesmo não podendo ser conduzidas no âmbito do presente estudo, ficam como desafios futuros para a linha de pesquisas em microvestígios e cálculos dentários.

A primeira e mais contundente questão enfrentada durante a pesquisa foi a contaminação do material preparado no ambiente do laboratório por amido recente. Desde os primeiros trabalhos publicados é possível acompanhar a preocupação com este aspecto que pode enviesar os resultados de uma pesquisa com material arqueológico (WESOLOWSKI, 2007). Trabalhos com outros microvestígios têm enfrentado situações semelhantes, e é notório, por exemplo, as preocupações com a contaminação dos estudos polínicos pelas chuvas de pólen naturais durante as análises e coletas de amostras (CHAVES; REINHARD, 2006) e assim por diante.

No caso dos cálculos, Wesolowski e colaboradores (2010) ressaltam a importância de prevenir ou minimizar este problema, que torna-se muito mais grave e leva a vieses muito maiores por serem os achados de amido nos cálculos muito reduzidos em número, fazendo com que qualquer contaminação impacte profundamente do ponto de vista qualitativo e quantitativo os resultados.

Trabalhos experimentais desenvolvidos por Laurence e colaboradores (2011) e estudo de materiais de uso cotidiano, como cosméticos mostram que a dispersão de amido de diferentes tipos nos nossos ambientes é importante uma vez que seu uso em diferentes produtos e materiais é larga. Por esta razão, anteriormente a este estudo, experimentos de

controle de ambiente já vinham sendo feitos nos laboratórios da ENSP, de maneira a avaliar o risco de tais situações para os resultados da pesquisa. Ainda que não publicados, foram realizados testes para medir a presença de grãos de amido de diferentes tipos e em diferentes condições de preservação e modificação no ar ambiente. Da mesma forma os cuidados empregados no controle de materiais usados na limpeza da vidraria (detergentes, por exemplo), que em alguns casos tiveram que ser substituídos, por conterem resíduos de amido. Finalmente a preocupação em usar materiais novos, e não reciclados, e em controlar a origem dos materiais adquiridos a partir de critérios de qualidade testados dentro do laboratório.

Em razão deste cenário, e com a experiência acumulada, foi feito um esforço adicional com ajustes metodológicos no presente estudo, de modo a permitir mais segurança na interpretação do reduzido número de grãos observados nas lâminas analisadas para o sambaqui de Cabeçuda.

Ao ser constatado que a contaminação era presente e os cuidados em seu controle eram insuficientes, restando sempre uma contaminação mínima foi necessário, portanto, assumir a mesma como “ruído de fundo” e tratar sua eliminação a partir do estabelecimento de um critério de mínimo de grânulos acima do qual passaríamos a aceitar o resultado como expressão da presença de amido no material arqueológico.

Devido à variedade de grânulos de amido encontrados nas lâminas de controle, não foi possível descartar a contaminação com base apenas nos tipos de grânulos encontrados nas mesmas.

Assim sendo, a pequena quantidade de grânulos encontrados na grande maioria das lâminas das amostras arqueológicas, levou a propor que os grânulos de amido encontrados seriam provenientes de uma possível contaminação do laboratório, e não dos cálculos dentários dos indivíduos do sambaqui.

Apesar de ter sido feito o possível para evitar contaminação durante o processamento dos dois grupos de amostras de cálculos dentários, a persistência de contaminação passou a exigir explicações. Nesse sentido foi possível verificar que algumas práticas descontinuadas podem explicar a persistência no ambiente de resíduos de amido. Uma delas foi o uso alternado por outros, de luvas com pó e sem pó no laboratório, já que o fornecimento do material é irregular.

Outro aspecto é que em determinado momento este contaminante pode estar ainda em suspensão no ar, contaminando as amostras processadas, mesmo que de maneira menos

perceptível. Se as luvas de vinil sem pó forem fabricadas no mesmo ambiente que as luvas com pó, elas carrearão alguma contaminação, o que foi observado em testes iniciais durante este estudo. Devido às suas características os grânulos de amido podem ficar suspensos em ar por longo tempo, o que favorece a contaminação seja na fábrica, seja no laboratório. O mesmo acontece com as lâminas e lamínulas que também podem vir contaminadas de fábrica. Foi testado o procedimento de lavagem destas lâminas com detergente Extran, a fim de deixá-las o mais livre possível de qualquer contaminante, mas mesmo refinando-se o processo de lavagem das lâminas houve contaminação nos testes. Por outro lado, a falta de pressão positiva e de isolamento dos ambientes de laboratório em relação aos ambientes externos torna quase impossível manter a estabilidade da descontaminação dentro dos laboratórios disponibilizados para este estudo.

Finalmente, outro importante aspecto modificado nesta dissertação foi a utilização de montagens para microscopia muito mais concentradas do que as preconizadas nos protocolos utilizados como base para a metodologia deste trabalho. Esta decisão deveu-se a intenção inicial de realizar também a microscopia de varredura nos microvestígios encontrados. Entretanto, esta outra forma de documentar o amido não pôde ser realizada.

Um desafio da preparação de material menos diluído era a dificuldade de observação e identificação pelo risco de mascaramento dos microvestígios. Os testes feitos anteriormente à preparação do material a ser estudado mostraram que seria possível, sem prejuízo das análises.

A aplicação desta variação da metodologia tornou possível o exame da totalidade do material processado, o que teve efeito não planejado, ou seja, o reforço da interpretação de serem as observações fruto apenas da contaminação, já que a quantidade esperada de amido residual de dieta nos cálculos, em especial considerando a concentração na preparação das amostras, deveria ser muito superior aos observados nos controles. Isto permitiu confirmar a utilidade dos limites de “ruído” empregados e a hipótese de ausência de amido (ou sua presença em níveis desprezíveis) nas amostras de Cabeçuda, na direção do proposto por Souza (1995).

Com a variação da metodologia observamos duas séries de amostras com diluições diferentes. Comparando grosseiramente a quantidade de grânulos de amido encontrados, na segunda série (mais concentrada, totalizando toda a amostra) esta quantidade parece ser ligeiramente maior do que a quantidade de grânulos encontrados na primeira série (diluída,

apresentando somente parte da amostra total). Tal evento é compatível com o esperado, mas também sugere que as amostras não tenham sido contaminadas durante a montagem de lâminas, visto que, considerando os grânulos como contaminação, se esta tivesse ocorrido durante as montagens, provavelmente não haveria essa flutuação. Corroborando com essa sugestão, observamos dois cálculos de dentes diferentes, do mesmo indivíduo, onde um deles foi preparado com uma maior concentração e outro com uma menor. O cálculo com preparação concentrada apresenta maior quantidade de amido do que as lâminas preparadas com uma menor concentração.

6.2. A AUSÊNCIA DE AMIDO IDENTIFICÁVEL E SEU SIGNIFICADO PARA A SAÚDE BUCAL NO CABEÇUDA

A quantidade de grânulos de amido acima do limite admitido como contaminação ou “ruído”, encontrada nos exemplares de cálculo dentário dos indivíduos sepultados no sambaqui de Cabeçuda, foi extremamente baixa, principalmente se comparada à contagem de amido em trabalhos com outras séries de sambaquis processadas por metodologia semelhante. Wesolowski (2007), por exemplo, encontra em 53 amostras analisadas um total de 555 grânulos de amido, enquanto Boyadjian (2012) em 19 amostras encontra 90 grânulos de amido. Nestes dois trabalhos, as médias de grãos por lâmina ficam em torno de 10 e 5, respectivamente, devendo-se observar que em ambos os casos as lâminas foram preparadas com diluição superior àquela empregada no presente trabalho, o que sugere que se fossem preparadas com igual concentração muito provavelmente apresentariam contagens muito mais altas de amido.

Mesmo que quiséssemos considerar a hipótese remota de que o amido encontrado nas amostras fosse originário da alimentação do grupo do sambaqui, ainda assim os valores extremamente baixos deste amido levariam a interpretar sua dieta como muito pobre em alimentos com reserva de amido importante, como tubérculos por exemplo. Muito embora este estudo não permita excluir completamente o consumo de amido por aquela população, é certo que um baixo consumo de alimentos amiláceos ajudaria a explicar o baixo índice de cárie encontrado nas séries esqueléticas do sambaqui de Cabeçuda por Salles Cunha na década de 60 e por Rodrigues-Carvalho (1997).

Até o atual momento, não há resultados de reconstituição de dieta vegetal para estes povos, e não devemos excluir completamente co-fatores tais como a resistência natural dos dentes (SALLES CUNHA, 1963b), ou os efeitos da dieta propostos por (ARAÚJO, 1970) pela alta ingestão de cálcio e vitaminas A e D, devido a sua subsistência adaptada a ambientes costeiros. Estudos mais recentes de paleobotânica feitos a partir de coletas em escavações na base do sítio arqueológico de Cabeçuda (dissertação em andamento no Museu Nacional) poderão acrescentar novos dados a esta discussão.

Outra proposta interpretativa discutida para este sítio em especial foi a de que bactérias do tipo *Vibrio* provenientes do meio aquático salino, pudessem condicionar um ambiente peculiar e menos cariogênico na boca. A presença de tais componentes nos biofilmes foi relatada no ambiente bucal por Gibbons e Van Houte, (1975); Rosebury, (1952); Loesche et al. (1985), incluindo *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e outros (BRAUDE; DAVIES; FIERER, 1986). Baseado no estilo de vida, dieta e ambiente em que habitavam os indivíduos do sambaqui de Cabeçuda, Mendonça de Souza (1995) propôs que uma possível presença de bactérias deste tipo faria com que estas agissem como agentes modificadores da cariogênese, já que variações na microbiota oral poderiam modular a atuação dos microorganismos. Seguindo esta hipótese, Pessanha (2015) estudou os mesmo cálculos dentários do sambaqui de Cabeçuda utilizados no presente trabalho, à procura de bactérias do tipo vibríões. O resultado da análise dos cálculos com base em microscopia de varredura identificou diferentes morfologias nos biofilmes dentários, mas não permitiu confirmar a presença predominante de vibríões, já que em apenas poucas imagens sua morfologia foi sugestiva. Entretanto, sua presença aparentemente pouco expressiva no biofilme dos cálculos, não excluiria sua presença determinante no ambiente da boca, já que Santos (1978) propõe que as bactérias do tipo vibríões teriam tendência a localizar-se preferencialmente nos sulcos gengivais. A literatura sugere que estas bactérias poderiam interferir, pela sua proximidade, no crescimento da placa bacteriana. Desta forma, dois fatores aparentemente poderiam estar colaborando para a redução da população de microorganismos cariogênicos na boca daqueles indivíduos: a dieta pobre em carboidratos e a modulação causada pela presença dos vibríões na ecologia da boca.

O ambiente em que estes grupos viviam, ao qual haviam se adaptado com uma economia de pesca e coleta costeiras, por sua vez, também contribuía com uma alta ingestão de proteína. Sabe-se que a ingestão de proteína, principalmente em grande quantidade, colabora para deixar o ambiente bucal mais alcalino, o que além de dificultar que as bactérias

acidifiquem o ambiente contribuindo para a desmineralização do esmalte dentário, favorece a rápida mineralização da placa dentária, formando os cálculos e inibindo as bactérias de atuarem no biofilme.

Os resultados deste estudo, apontando para a quase ausência de amido nos cálculos dentários, tornam possível confirmar que a dieta deve ter colaborado com o baixo de índice de cárie deste sítio. Uma vez que não só os açúcares, mas também os carboidratos da dieta são fatores ligados ao aparecimento da cárie dental, um baixo consumo do mesmo reforça inegavelmente a explicação para tal índice, já que os carboidratos funcionam como combustível para a cariogênese, através da fermentação e liberação de ácidos que desmineralizam o esmalte dentário abrindo a formação de cárie.

Assim, é possível propor que o índice de cárie descrito para os indivíduos sepultados neste sítio possa ser resultado da junção de ao menos três fatores. Os vibriões poderiam modular a atuação das bactérias cariogênicas, diminuindo sua atividade no biofilme; o baixo consumo de carboidrato acarretaria em pouco substrato a ser fermentado pelas bactérias; e o alto consumo de proteína, além de fazer com que o ambiente bucal permanecesse alcalinizado, ajudaria a assegurar a constituição dos tecidos dentários, conferindo mais resistência e saúde aos dentes.

7. CONCLUSÕES

O achado de grânulos de amido nos cálculos dentários estudados foi interpretado como originado da contaminação por amido atual durante o processamento. Este amido provavelmente estava disperso no ambiente do laboratório, ainda que em quantidade mínima.

Considerando que apenas duas lâminas apresentaram poucos grânulos de amido acima do limite adotado como parâmetro para a interpretação, e portanto poderiam ser provenientes dos cálculos dentários, considerou-se como resultado final que praticamente inexistem amidos nos cálculos dentários dos 25 indivíduos estudados para o sambaqui de Cabeçuda.

O resultado aponta para um baixo consumo de carboidratos pelos grupos estudados, o que está coerente com os resultados de estudos dos dentes apresentados na literatura, ou seja, com a ausência de cárie nos dentes destes indivíduos.

O resultado do estudo do microfilme nos mesmos cálculos dentários, feito anteriormente, embora não confirmando a presença dos vibriões de água salina, já sugere que uma modificação da ecologia do ambiente bucal, principalmente associada ao alto consumo de proteínas, poderia reduzir a atividade cariogênica.

Com o presente resultado conclui-se, portanto, que havendo também baixo consumo de carboidratos seria ainda menos provável o desenvolvimento de cáries naqueles indivíduos.

Finalmente, como desdobramento das adaptações na técnica empregada, concluímos que é possível, sem prejuízo da qualidade e da confiabilidade da leitura, fazer montagens de lâminas com maior concentração de material proveniente da dissolução dos cálculos, sendo essa forma de preparação conveniente como demonstrado no presente caso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, J. A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721–5732, nov. 2005.
- ABDELLATIF, A. M.; HEGAZY, S. A.; YOUSSEF, J. M. The oral health status and salivary parameters of Egyptian children on haemodialysis. **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 4, p. 313–318, out. 2011.
- ARAÚJO, E. M. DE. **Afeções dentárias Hiper cementose e abrasão das populações do litoral de Santa Catarina**. Anais do museu de antropologia da universidade de Santa Catarina. **Anais...** In: ANAIS DO MUSEU DE ANTROPOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SANTA CATARINA. Santa Catarina: 1970
- ARMITAGE, P. The Extraction and Identification of Opal Phytoliths from the Teeth of Ungulates. **Journal of Archaeological Science**, v. 2, p. 187–97, 1975.
- BABOT, M. Starch grain damage as an indicator of food processing. In: **Phytolith and starch research in the Australian-Pacific-Asian regions: the state of the art: papers from a conference held at the ANU, August 2001, Canberra, Australia**. Terra Australis. Canberra: Hart, DM, Wallis LA, 2003. p. 200.
- BABOT, M. Damage on Starch from Processing Andean Food Plants. In: **Ancient Starch Research**. Walnut Creek, California: Left Coast Press, 2006. p. 66–69.
- BASTOS, Q. **Mobilidade Humana no Litoral Brasileiro: análise de isótopos de estrôncio no sambaqui do Forte Marechal Luz**. Dissertação de mestrado—Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - FIOCRUZ, 2009.
- BECK, W.; TORRENCE, R. Starch Pathways. In: **Ancient Starch Research**. Walnut Creek, California: Left Coast Press, 2006. p. 53–74.
- BILIADERIS, C. G. Structural transitions and related physical properties of starch. In: **Starch: chemistry and technology**. Food science and technology. 3. ed ed. London: Academic Press, 2009. p. 253–359.
- BOYADJIAN, C. **Microvestígios contidos no cálculo dentário como evidência do uso de recursos vegetais nos sambaquis de Jabuticabeira II (sc) e Moraes (sp)**. Dissertação de Mestrado—São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2007.
- BOYADJIAN, C. **Análise e identificação de microvestígios vegetais de cálculo dentário para a reconstrução de dieta sambaqueira: estudo de caso de Jabuticabeira II, SC**. Tese de Doutorado—São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2012.
- BUCKLEY, S. et al. LER - Dental Calculus Reveals Unique Insights into Food Items, Cooking and Plant Processing in Prehistoric Central Sudan. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e100808, 16 jul. 2014.

CAMERON, R. E.; DONALD, A. M. A small-angle x-ray scattering study of starch gelatinization in excess and limiting water. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 31, n. 9, p. 1197–1203, ago. 1993.

CASTRO FARIA , L. **De Sculptures en pierre des paleoamériens de la cote meridionale du Brésil : les zoolithes de Santa Catarina** . In : IVe. . Congrès Internationale des Sciences Anthropologiques et Ethnologiques. Viena, 1955.

CHAMPE, P.; HARVEY, R.; FERRIER, D. **Bioquímica Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CHAVES, S. A. DE M.; REINHARD, K. J. Critical analysis of coprolite evidence of medicinal plant use, Piauí, Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 237, n. 1, p. 110–118, jul. 2006.

CHIU, C.-W.; SOLAREK, D. Modification of starches. In: **Starch: Chemistry and Technology**. 3ed. ed. London: Academic Press, 2009. p. 629–648.

CHOU, K. S.; TSAI, J. C.; LO, C. T. The adsorption of Congo red and vacuum pump oil by rice hull ash. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 2, p. 217–219, jun. 2001.

CHOW, M. H.; PETERSON, D. S. Dental management for children with chronic renal failure undergoing hemodialysis therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 48, n. 1, p. 34–38, jul. 1979.

COLONESE, A. C. et al. Long-Term Resilience of Late Holocene Coastal Subsistence System in Southeastern South America. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93854, 9 abr. 2014.

CONN, H.; LILLIE, R. **Conn's Biological Stains: A Handbook on the Nature and Uses of the Dyes Employed in the Biological Laboratory**. 8. ed. Baltimor: The Williams and Wilkins Company, 1969.

CORTELLA, A. R.; POCHETTINO, M. L. Starch grain analysis as a Microscopic Diagnostic Feature in the Identification of Plant Material. **Economic Botany**, v. 48, n. 2, p. 171–181, abr. 1994.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual review of microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

COULTATE, T. **Alimentos: Química de seus componentes**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CUMMINGS, J.; ROBERFROID, M. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. **Eur. j. clin. nutr.**, v. 51, n. 7, p. 417–23, 1997.

CURY, J. A. et al. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. **Brazilian Dental Journal**, v. 14, n. 3, p. 147–152, 2003.

DE STOPPELAAR, J. D.; VAN HOUTE, J.; BACKER DIRKS, O. The effect of carbohydrate restriction on the presence of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in human dental plaque. **Caries Research**, v. 4, n. 2, p. 114–123, 1970.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, 2009.

EPSTEIN SR, Mandel ID, Scopp IW. Salivary composition and calculus formation in patients undergoing hemodialysis. *J Periodontol* 1980; 51: 336-8.

FEIJÓ, I.; IWASAKI, K. Carie e dieta alimentar. **Uningá Review**, v. 19, n. 3, p. 44–50, 2014.

FIGUEIREDO, A. **Alterações na morfologia de grânulos de amidos submetidos a diferentes processos de cocção**. Trabalho de Conclusão de Curso—Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio, 2012.

FIGUEIREDO, A.; WESOLOWSKI, V.; MENDONÇA DE SOUZA, S. **Microfossil concentration in dental calculi: what does it mean?** Paleopathology Association Meeting in South America - PAMINSA V. **Anais...** In: PALEOPATHOLOGY ASSOCIATION MEETING IN SOUTH AMERICA - PAMINSA V. Santa Marta, Colômbia: Agosto 2013

FIGUTI, L. O homem pré-histórico, o molusco e o sambaqui: considerações sobre a subsistência dos povos sambaquieiros. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, n. 3, p. 67–80, 1993.

FLORIO, F. M. et al. Time of initial acquisition of mutans streptococci by human infants. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 28, n. 4, p. 303–308, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; JOINT FAO/WHO EXPERT CONSULTATION ON CARBOHYDRATES IN HUMAN NUTRITION (1997. **Carbohydrates in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Rome, 14-18 April 1997**. Rome: World Health Organization : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998.

FOX CL; JUAN J; ALBERT RM. Phytolith analysis on dental calculus, enamel surface, and burial soil: information about diet and paleoenvironment. **Am J Phys Anthropol**, v. 101, n. 1, p. 101–13, 00PY - 1996 1996.

FREITAS, T. S.; LEONEL, M. Amido resistente em fécula de mandioca extrusada sob diferentes condições operacionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 2, p. 183–190, 2009.

GALLANT, D. J.; BOUCHET, B.; BALDWIN, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, n. 3–4, p. 177–191, mar. 1997.

GASPAR, M. Considerations of the sambaquis of the Brazilian coast. **Antiquity**, v. 72, p. 592–615, 1998.

GASPAR, M. **Sambaqui: arqueologia do litoral Brasileiro**. 2. ed. [s.l.] Jorge Zahar Editor, 2004.

GASPAR, M. et al. Sambaqui (Shell Mound) societies of coastal Brazil. In: **Handbook of South American Archaeology**. New York: Springer, 2008. p. 319–338.

GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 29:19-42, 1975.

GUIMARÃES, M.S.B.C. Do lixo ao luxo: as premissas teórico-metodológicas e a noção de sambaqui. *Boletim do Museu Nacional*, 63:1-23, 2003.

HARDY, K. et al. Starch granules, dental calculus and new perspectives on ancient diet. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 2, p. 248–255, fev. 2009.

HART, T. C.; IVES, T. H. Preliminary starch grain evidence of ancient stone tool use at the Early Archaic (9,000 BP) site of Sandy Hill, Mashantucket, Connecticut. **Ethnobiology Letters**, v. 4, p. 87–95, 2013.

HENRY, A. G.; BROOKS, A. S.; PIPERNO, D. R. 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**, v. 108, n. 2, p. 486–491, 11 jan. 2011a.

HENRY, A. G.; BROOKS, A. S.; PIPERNO, D. R. LER Reply to Collins and Copeland: Spontaneous gelatinization not supported by evidence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 22, p. E146–E146, 31 maio 2011b.

HENRY, A. G.; HUDSON, H. F.; PIPERNO, D. R. Changes in starch grain morphologies from cooking. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 3, p. 915–922, mar. 2009.

HENRY, A. G.; PIPERNO, D. R. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqā'i, Syria. **Journal of Archaeological Science**, v. 35, n. 7, p. 1943–1950, jul. 2008.

HORROCKS, M. et al. Starch grains and xylem cells of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and bracken (*Pteridium esculentum*) in archaeological deposits from northern New Zealand. **Journal of Archaeological Science**, v. 31, n. 3, p. 251–258, mar. 2004.

IMFELD, T. N. **Identification of low caries risk dietary components: and 24 tables**. Basel: Karger, 1983.

IRIARTE, J. et al. Evidence for cultivar adoption and emerging complexity during the mid-Holocene in the La Plata basin. **Nature**, v. 432, n. 7017, p. 614–617, 2004.

JENSEN, M. E. Diet and dental caries. **Dental Clinics of North America**, v. 43, n. 4, p. 615–633, out. 1999.

JIN, Y.; YIP, H. Supragingival calculus: Formation and control. **Critical Reviews In Oral Biology And Medicine**, v. 13, n. 5, p. 426–41, 2002.

KASHKET, S.; YASKELL, T.; MURPHY, J. E. Delayed effect of wheat starch in foods on the intraoral demineralization of enamel. **Caries Research**, v. 28, n. 4, p. 291–296, 1994.

KASHKET, S.; ZHANG, J.; VAN HOUTE, J. Accumulation of fermentable sugars and metabolic acids in food particles that become entrapped on the dentition. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 11, p. 1885–1891, nov. 1996.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 108–125, 2002.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 413–437, 2000.

LAMB, J.; LOY, T. Seeing red: the use of Congo Red dye to identify cooked and damaged starch grains in archaeological residues. **Journal of Archaeological Science**, v. 32, n. 10, p. 1433–1440, out. 2005.

LAURENCE, A. R. et al. Airborne Starch Granules as a Potential Contamination Source at Archaeological Sites. **Journal of Ethnobiology**, v. 31, n. 2, p. 213–232, dez. 2011.

LIEVERSE, A. R. Diet and the Aetiology of Dental Calculus. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 9, p. 219–232, 1999.

LINEBACK, D. R.; WONGSRIKASEM, E. Gelatinization of starch in baked products. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 1, p. 71–74, jan. 1980.

LINGSTRÖM, P. et al. pH measurements of human dental plaque after consumption of starchy foods using the microtouch and the sampling method. **Caries Research**, v. 27, n. 5, p. 394–401, 1993.

LOBO, A. R.; SILVA, G. DE L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 219–226, 2003.

LOESCHE, W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev.**, v. 50, n. 4, p. 353–80, 1986.

LOESCHE, W.J.; SYED, S.A.; SCHMID, E.; MORRISON, E.C. Bacterial Profiles of Subgingival Plaques in Periodontitis. *J. Periodontol.* Vol. 56. N. 08, 1985.

LOY, T. Methods in the analysis of starch residues on prehistoric stone tools. In: **Tropical archaeobotany: Applications and new developments**. Londres: Rotledge, 1994. p. 86–114.

MEHTA, S.; RAJPUT, Y. S. A method for staining of proteins in nitrocellulose membrane and acrylamide gel using Congo red dye. **Analytical Biochemistry**, v. 263, n. 2, p. 248–251, 15 out. 1998.

MENAKER, L.; MORHART, R. E.; NAVIA, J. M. **Bases biológicas de la caries dental**. Barcelona: Salvat, 1986.

MENDONÇA DE SOUZA, S. M. F. **Estresse, doença e adaptabilidade: Estudo comparativo de dois grupos pré-históricos em perspectiva biocultural**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, 1995.

MESSNER, T. C.; SCHINDLER, B. Plant processing strategies and their affect upon starch grain survival when rendering *Peltandra virginica* (L.) Kunth, Araceae edible. **Journal of Archaeological Science**, v. 37, n. 2, p. 328–336, fev. 2010.

MIDDLETON, W. An improved method for extraction of opal phytolith from cervid dental tartar. **The Phytolitharien newsletter**, v. 6, p. 2–5, 1990.

MIDDLETON, W. Extraction of opal phytoliths from herbivore dental calculus. **Journal of Archaeological Science**, v. 21, p. 469–73, 1994.

MÖRMANN, J. E.; MÜHLEMANN, H. R. Oral starch degradation and its influence on acid production in human dental plaque. **Caries Research**, v. 15, n. 2, p. 166–175, 1981.

NEFF, D. Acid Production from Different Carbohydrate Sources in Human Plaque in situ. **Caries Research**, v. 1, n. 1, p. 78–87, 1967.

NYVAD, B.; KILIAN, M. Comparison of the Initial Streptococcal Microflora on Dental Enamel in Caries-Active and in Caries-Inactive Individuals. **Caries Research**, v. 24, n. 4, p. 267–272, 1990.

OLIVEIRA LIMA, J.E. Cárie dentária: um novo conceito. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**. Maringá, v. 12, n. 6, p. 119-130, nov./dez. 2007.

PACHECO, M. **Tabela de equivalentes, medidas caseiras e composição química dos alimentos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2006.

PASTER, B. J. et al. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3770–3783, 15 jun. 2001.

PEARSALL, D. **Paleoethnobotany: A handbook of procedures**. Nova York: Academic Press, 2000.

PEREDA, J. **Tecnologia dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEREIRA, G.A.; NEVES, M.A.; TRINDADE, C. A. Imunologia da Carie dentária. *Acta. Med. Port.*; 23: 663-668, 2010.

PERÉZ, S.; BALDWIN, P. M.; GALLANT, D. J. Structural features of starch granules I. In: **Starch: Chemistry and Technology**. Food science and technology. London: Academic Press, 2009. p. 149–188.

PERINETTI, G. et al. Risk/prevention indicators for the prevalence of dental caries in schoolchildren: results from the Italian OHSAR Survey. *Caries Res.*, Basel, v. 39, n. 1, p. 9-19, 2005.

PESSANHA, T. “Uma investigação paleoepidemiológica sobre a cárie dentária em perspectiva epidemiológica e microbiológica” apresentada por Thaíla Santos.

Dissertação de Mestrado—Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, 2015.

PIPERNO, D. R. et al. Starch grains reveal early root crop horticulture in the Panamanian tropical forest. **Nature**, v. 407, p. 894–897, 2000.

PIPERNO, D. R.; DILLEHAY, T. D. Starch Grains on Human Teeth Reveal Early Broad Crop Diet in Northern Peru. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, n. 50, p. 19622–7, 2008.

PIPERNO, D. R.; HOLST, I. The presence of starch grains on prehistoric stone tools from the humid neotropics: indications of early tuber use and agriculture in Panama. **Journal of Archaeological Science**, v. 25, n. 8, p. 765–776, 1998.

PREISS, J. Biochemistry and molecular biology of starch biosynthesis. In: **Starch: Chemistry and Technology**. Food science and technology. 3. ed. London: Academic Press, 2009. p. 84–139.

PROUS, A. **Arqueologia brasileira**. Brasília, DF: Editora UnB, 1991.

RAMESH, H.; THARANATHAN, R. Water-extracted polysaccharides of selected cereals and influence of temperature on the extractability of polysaccharides in sorghum. **Food Chemistry**, v. 64, p. 345–350, 1999.

REINHARD, K. et al. microfossils in dental calculus a new perspective on diet and dental disease. In: **Human remains: conservation, retrieval, and analysis: proceedings of a conference held in Williamsburg, VA, Nov. 7-11th, 1999**. Oxford, England: Archaeopress, 2001. p. 113–118.

REINHARD, K.; EGGERS, S. **Soil analysis of a sambaqui burial**. . In: XII CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ARQUEOLOGIA BRASILEIRA. São Paulo: 2003

ROBERTSON, G. Crushed starch granules and electron microscopy. In: **Ancient starch research**. Walnut Creek, California: Left Coast Press, 2006. p. 68–69.

RODRIGUES-CARVALHO, C. **Patologias e processos dento-maxilares em remanescentes esqueléticos de dois sítios pré-históricos no Brasil: o cemitério de Furna do Estrago (PE) e o Sambaqui de Cabeçuda (SC)**. Dissertação de mestrado—Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, 1997.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. **Microbes and infection**, v. 2, n. 13, p. 1599–1607, 2000.

ROSEBURY. **Bacterial and mycotic infections of man**. 2nd, ed. Lippincott, Philadelphia p. 690-706, 1952.

SALLES CUNHA, E. DE M. **Sambaquis e outras jazidas arqueológicas: paleopatologia dentária e outros assuntos**. Rio de Janeiro: Científica, 1963a.

SALLES CUNHA, E. DE M. Afecções alvéolo-dentárias da população do sambaqui de Cabeçuda. **Revista do Museu Paulista**, v. 14, p. 523–529, 1963b.

Samaranayake, L. **Fundamentos de Microbiologia e Imunologia na Odontologia**, 4 a EDIÇÃO. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 382p.

SANTOS, A. **Extração e caracterização do amido do fruto-do-Lobo (*Solanum Lycocarpum* St. Hil) e elaboração de filmes Biodegradáveis**. Mestrado em Ciências Moleculares—Anápolis, GO: Unversidade Estadual de Goiás, 2009.

SANTOS, A.A.C. Estudos de Vibrios anaeróbicos da cavidade oral. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978.

SCHEEL-YBERT, R. Paleo ambiente e paleoetnologia de populacoes sambaqueiras do sudeste do estado do Rio de janeiro. **Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 9, p. 43–59, 1999.

SCHEEL-YBERT, R. Man and Vegetation in Southeastern Brazil during the Late Holocene. **Journal of Archaeological Science**, v. 28, n. 5, p. 471–480, maio 2001.

SCHEEL-YBERT, R. et al. Novas perspectivas na reconstituição do modo de vida dos sambaqueiros: uma abordagem multidisciplinar. **Revista de Arqueologia**, v. 16, n. 1, 2003.

SCHIEE, A.A. Mechanisms of dental plaque formation. *Adv. Dent. Res.* 8: 246-253. 1994.

SHKLAIR, I. L. et al. S. mutans glugan production and proximal caries activity in rats. **J. Dental Res.**, Chicago, Sp. Issue A v. 58, p. 377, 1979

SILVA, A. C. B. DA et al. Detection of oral streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 648–651, 2008.

TEIXEIRA, I. **A Prática da Horticultura entre os Construtores de Sambaquis e Acampamentos Litorâneos da Região da Baía de São Francisco**. Dissertação de Mestrado—Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - FIOCRUZ, 2010.

THOMAS, D.; ATWELL, W. **Starches: Pratical Guides for the Food Industry**. Minessota: Eagan Press, 1999.

TORRENCE, R.; BARTON, H. (EDS.). **Ancient starch research**. Walnut Creek, Calif: Left Coast Press, 2006.

UGENT, D.; DILLEHAY, T.; RAMIREZ, C. Potato remains from a late pleistocene settlement in southcentral Chile. **Economic Botany**, v. 41, n. 1, p. 17–27, jan. 1987.

UGENT, D.; POZORSKI, S.; POZORSKI, T. Archaeological potato tuber remains from the casma valley of peru. **Economic Botany**, v. 36, n. 2, p. 182–192, abr. 1982.

UGENT, D.; POZORSKI, S.; POZORSKI, T. Archaeological manioc (*Manihot*) from Coastal Peru. **Economic Botany**, v. 40, n. 1, p. 78–102, jan. 1986.

WALSHAW, S. C. **Reconstruction of environment in early bronze age syria through phytolith analysis on human dental calculus**. Dissertação de mestrado—Edmonton, Alberta: University of Alberta, 1999.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência rural**, v. 35, n. 4, 2005.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; PERDOMO, D. M. X. Amido disponível e resistente em alimentos: adaptação do método da AOAC 996.11. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 39–43, 2005.

WESOLOWSKI, V. **Cáries, desgaste, cálculos dentários e micro-resíduos da dieta entre grupos pré-históricos do litoral norte de Santa Catarina: É possível comer amido e não ter cárie?** Tese de Doutorado—Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - FIOCRUZ, 2007.

WESOLOWSKI, V. et al. 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**, v. 17, p. 191–210, 2007.

WESOLOWSKI, V. et al. Evaluating microfossil content from Brazilian Sambaquis. **Journal of Archaeological Science**, v. 37, n. 6, p. 1326–38, 2010.

WESTON, J. Seeing red: The use of a biological stain to identify cooked and processed/damaged starch grains in archaeological residues. In: **New directions in archaeological science**. Acton, A.C.T.: ANU E Press, 2009. p. 77–91.

WITTMACK, L. **Our Present Knowledge of Ancient Plants**. L. Wittmack ... [s.l: s.n.].

ZARRILLO, S.; KOOYMAN, B. Evidence for Berry and Maize Processing on the Canadian Plains from Starch Grain Analysis. **American Antiquity**, v. 71, n. 3, p. 473, 1 jul. 2006.