

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ESTUDO PALEOPARASITOLÓGICO E PALEOGENÉTICO DO SÍTIO
ARQUEOLÓGICO PRÉ-COLOMBIANO GRUTA DO GENTIO II, UNAÍ,
MINAS GERAIS, BRASIL.

LUDMILA LIMA GURJÃO

Rio de Janeiro
Abril de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUDMILA LIMA GURJÃO

Estudo Paleoparasitológico e Paleogenético do Sítio Arqueológico Pré-Colombiano Gruta Do Gentio II, Unaí, Minas Gerais, Brasil.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dra. Alena Mayo Iñiguez

RIO DE JANEIRO

Abril de 2019

Gurjão, Ludmila Lima.

Estudo Paleoparasitológico e Paleogenético do Sítio Arqueológico Pré-Colombiano Gruta do Gentio II, Unai, Minas Gerais, Brasil. / Ludmila Lima Gurjão.
- Rio de Janeiro, 2019.

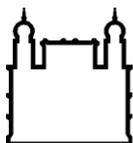
xvi, 95f f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Alena Mayo Iñiguez.

Bibliografia: f. 80-94

1. Paleoparasitologia. 2. Paleogenética. 3. Populações pré-colombianas.
4. Paleoecologia . 5. Sistema de classificação de coprólitos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: LUDMILA LIMA GURJÃO

**ESTUDO PALEOPARASITOLÓGICO E PALEOGENÉTICO DO SÍTIO
ARQUEOLÓGICO PRÉ-COLOMBIANO GRUTA DO GENTIO II, UNAÍ, MINAS
GERAIS, BRASIL**

ORIENTADOR: Prof. Dra. Alena Mayo Iñiguez

Aprovada em: 30/04/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Jr – Presidente IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Paulo Seda - Departamento de Arqueologia UERJ

Prof. Dr. Márcio Pavan - IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Luís Cláudio – IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Gláucia Sene - Departamento de Arqueologia UERJ

Rio de Janeiro, abril de 2019

Dedico este trabalho à Deus que me amou primeiro, minha família que sempre me apoiou de forma amorosa e contente. E a todos que me inspiraram e me deixaram mais apaixonada pela Paleoparasitologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus antes de tudo, por me guiar, me dar forças e me proporcionar a chance de estudar esta incrível ciência que me fascina e me deixa tão realizada. Acreditar no amor de Deus e perceber sua presença nas pequenas coisas e nos pequenos gestos, é a mais bela poesia e o melhor acalento para alma.

Agradeço aos meus pais e a minha irmã por sempre me impulsionarem a seguir meus sonhos e fazer o que amo e admiro. Por me darem o primeiro exemplo de perseverança, garra, companheirismo e amor. Seguimos juntos todos os dias.

Agradeço à minha vó maravilhosa que com toda sua doçura nunca deixou de me guiar pelo caminho justo da vida, que me mostra todos os dias o quanto Deus é soberano e sabe exatamente nossa necessidade. O que vale nesta vida é amar ao próximo e ser feliz.

Agradeço à toda minha família pelo suporte, que mesmo à distância, nunca deixou de me incentivar a ser incrivelmente feliz e dar sempre o melhor de mim em todas as ocasiões.

Agradeço às incríveis mulheres da minha família pelas orações e por me inspirarem a ser uma pessoa justa, corajosa e gentil. Sempre.

Agradeço aos meus amigos pelo companheirismo em todos os momentos felizes e tristes. Pelas memórias leves e acolhedoras. Pelos abraços verdadeiros e as palavras de encorajamento. Que seus corações sejam sempre cheios de ternura. Aos amigos de muitos anos de Belém que sempre estarão no meu coração e que sempre me recebem como pela primeira vez, aos amigos do Rio que me ensinaram a desfrutar das belezas da cidade maravilhosa e aos amigos distribuídos pelo Brasil, que sempre estiveram ao meu lado. Agradeço a Murilo Rodrigues pelo suporte.

Agradeço à minha incrível orientadora Dra. Alena Mayo Iñiguez por toda a dedicação, paciência e comprometimento. Pois mesmo quando eu cheguei até sua mesa com somente sonhos e vontade de aprender, me acolheu e me ensinou os caminhos da ciência.

Agradeço a todos pesquisadores, técnicos, terceirizados, tecnologistas, colegas e amigos do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos pelos compartilhamentos de memórias científicas, suporte na aprendizagem, confidências e risadas. Assim como os amigos que a paleoparasitologia me deu, que igualmente a mim, compartilham o amor e a paixão por esta ciência.

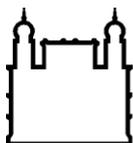
Agradeço a todos os professores e profissionais vinculados a pós-graduação em Biologia Parasitária do IOC/FIOCRUZ pelos ensinamentos de comprometimento com todas as formas de vida que rodeiam a Terra.

Agradeço ao Instituto de Arqueologia Brasileira por nos proporcionar sem pensar duas vezes, os mais belos materiais arqueológicos para estudos. Agradeço também a todos os arqueólogos envolvidos em todas as etapas de escavação, análises e que contribuíram para o estudo da Gruta do Gentio II

Agradeço aos órgãos de fomento pelo financiamento e confiança.

Agradeço à toda e qualquer pessoa que ajudou no desenvolvimento deste projeto. Professores, pesquisadores, alunos, técnicos, arqueólogos, antropólogos, terceirizados, funcionários que ajudaram na limpeza e mantimento dos laboratórios. A todos, muito obrigada!

E finalmente, agradeço à Fundação Oswaldo Cruz por me mostrar, todos os dias, que todo tipo de ciência é válida em sua essência, e que apesar das dificuldades, ela vive dentro de cada um de nós.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

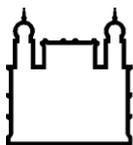
ESTUDO PALEOPARASITOLÓGICO E PALEOGENÉTICO DO SÍTIO ARQUEOLÓGICO PRÉ-COLOMBIANO GRUTA DO GENTIO II, UNAÍ, MINAS GERAIS, BRASIL.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ludmila Lima Gurjão

A Paleoparasitologia, o estudo de parasitos encontrados em materiais arqueológicos, foi criada como ramo da Parasitologia com o objetivo principal de estudar a origem e evolução de infecções parasitárias. Igualmente, a Paleogenética tendo como fonte de estudo o DNA antigo, tem fornecido informação genética não só do parasito, mas também do hospedeiro, da dieta e do ambiente. Estudos paleoparasitológicos em populações ancestrais têm contribuído com o conhecimento da origem, introdução e dispersão dos parasitos, assim como das migrações de seus hospedeiros humanos. O sítio arqueológico pré-colombiano Gruta do Gentio II (GGII) (12,000 – 410 A.P.) possui vestígios de sepultamentos humanos, restos alimentares e artefatos culturais como cerâmicas. Coprólitos (fezes fossilizadas e dessecadas), foram encontrados distribuídos nas diversas camadas estratigráficas dos 16 setores escavados. Neste estudo, coprólitos (n=80) de diferentes morfologias e morfometrias foram submetidos a um sistema de classificação de coprólitos segundo Jouy-Avantin e colaboradores (2003). As amostras foram analisadas para a identificação da origem animal e de presença de parasitos gastrointestinais, com o objetivo de entender sobre o panorama de infecções parasitárias por helmintos e a paleoecologia do sítio arqueológico. As amostras foram reidratadas e submetidas a análise paleoparasitológica por microscopia de luz, análise paleogenética por PCR e sequenciamento nucleotídico para a determinação da origem animal ou humana dos coprólitos. Foram identificados 669 fragmentos de coprólitos em 11 estratos, com 4 volumes distintos e 10 padrões de coloração. A análise paleoparasitológica demonstrou a presença de 5 táxons de parasitos: Capillariidae, *Trichostrongylus* sp., Ancylostomatidae, *Echinostoma* sp. e *Spirometra* sp. Os resultados paleogenéticos permitiram a identificação de coprólitos de diversos animais silvestres como onça pintada, jaguatirica, gambá de orelha branca e cuíca. Os gráficos de integração dos dados da paleoparasitologia e paleogenética no contexto arqueológico, são discutidos para propor um cenário paleoecológico da infecção no sítio GGII. O estudo contribui para um maior entendimento da dinâmica das infecções parasitárias no período pré-colombiano do Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PALEOPARASITOLOGICAL AND PALEOGENETICAL STUDY OF THE PRE – COLUMBIAN
ARCHEOLOGICAL SITE GRUTA DO GENTIO II, UNAÍ, MINAS GERAIS, SOUTHEAST OF BRAZIL

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Ludmila Lima Gurjão

Paleoparasitology, the study of parasite findings in archeological materials, was created as a branch of parasitology, with the principal goal of studying the origin and evolution of parasitic infections. Equally, paleogenetics has focus in study of ancient DNA, providing genetic information of parasites, hosts, diet and the environment. Paleoparasitological studies in ancient population are contributing with the origin, introduction and dispersion of parasites, as well as migrations of the human host. In the pre-Columbian archeological site Gruta do Gentio II (GGII) (12.000-410 A.P.) elements of human burials, food remains and cultural artefacts as pottery were found. Coprolites (fossilized or desiccated feces), where found distributed in several stratigraphical layers of 16 sectors in GGII. In this study, coprolites (n=80) with different morphometries and morphologies were submitted to a classification system of coprolites proposed by Jouy-Avantin and collaborators (2003). The samples were analyzed for the identification of animal origin and the presence of gastrointestinal parasites, with the intent to understand about the panorama of helminth parasitic infections and the paleoecology, the study of GGII site ecosystems, in the past. The samples were rehydrated and submitted to paleoparasitological analyses through light microscopy. Paleogenetic analyses were conducted by PCR and nucleotide sequencing for origin determination. Were identified 669 coprolites fragments in 11 layers, with 4 types of volume and 10 patterns of color. The paleoparasitological analyses showed the presence of 4 parasites taxon of Capillariidae, *Trichostrongylus* sp., Ancylostomatidae, *Echinostoma* sp. and *Spirometra* sp. The paleogenetic result allowed the identification of diverse animal coprolites, as jaguar, ocelot, white-ear opossum and gray four-eyed opossum. The graphics of paleoparasitological and paleogenetic data integration in the archeological context, were discussed to propose a paleoecological scenario of infection in GGII site. The study contributed to a major knowledge about parasitic infection dynamics in the pre-Columbian period of Brazil.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	A Paleoparasitologia	15
1.2	A Paleogenética	19
1.3	O Sítio Arqueológico Gruta do Gentio II.....	21
1.4	Justificativa.....	25
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Medidas Para a Análise Paleogenética.....	26
3.2	Coleta	27
3.3	Sistema de Classificação de Coprólitos.....	27
3.4	Análise Paleoparasitológica	31
3.4.1	<i>Teste de tempo de reidratação</i>	<i>32</i>
3.4.2	<i>Análise morfológica e morfométrica de ovos de parasitos</i>	<i>32</i>
3.5	Análise Paleogenética.....	33
3.6	Análise integrada de resultados do sítio gruta do gentio II.....	34
4	RESULTADO	36
4.1	Análise da ficha de dados de classificação de coprólitos.....	36
4.2	Análise Paleoparasitológica	42
4.2.1	<i>Teste de tempo de reidratação</i>	<i>42</i>
4.2.2	<i>Identificação de parasitos.</i>	<i>44</i>
4.3	Análise Paleogenética.....	53
4.4	Análise integrada dos coprólitos do sítio Gruta do Gentio II	55

5	DISCUSSÃO	56
5.1	Descrição morfológica e integrada dos coprólitos do Sítio Gruta do Gentio II	56
5.2.	Paleoparasitologia	68
5.3	Paleogenética.....	76
6	CONCLUSÕES	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

Figura 1: Imagem do interior do Sítio Arqueológico Gruta do Gentio II durante as escavações em 1976.....	21
Figura 2: Imagem de um corte transversal da disposição das camadas inseridas setores NA1, NA2, NA3 e NA4.....	23
Figura 3: Vestígios humanos encontrados durante as escavações do Sítio Arqueológico Gruta do Gentio II	24
Figura 4: Ficha de dados de classificação de coprólitos	28
Figura 5: Ficha de referência de atributos do sistema de classificação de coprólitos	29
Figura 6: Imagem de fezes de mamíferos terrestres do nordeste brasileiro	30
Figura 7: Representação do <i>Munsell Soil Chart</i> utilizado como referência para a identificação das cores tanto internas quanto externas dos coprólitos neste estudo	31
Figura 8: Imagens dos dados morfológicos e morfométricos considerados na análise dos ovos de parasitos neste estudo	32
Figura 9: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 20/30cm.....	35
Figura 10: Ficha de dados de classificação de coprólitos da amostra GG01	37
Figura 11: Morfologia dos coprólitos analisados similares as fezes de mamíferos.	38
Figura 12: Morfologia dos coprólitos analisados diferentes das fezes de mamíferos.....	38
Figura 13: Ovo de capilarídeo da amostra GG01	46
Figura 14: Ovo de capilarídeo da amostra GG15	46
Figura 15: Ovo de capilarídeo da amostra GG15.....	47
Figura 16: Ovo de capilarídeo da amostra GG33	47
Figura 17: Ovo de capilarídeo da amostra GG51	48
Figura 18: Ovos de ancilostomídeo encontrados neste estudo	48
Figura 19: Ovos e trichostrongilídeo encontrados neste estudo	49
Figura 20: Ovos de <i>Spirometra</i> sp. C; D - Ovos de <i>Echinostoma</i> sp. Todos na amostra GG38.....	49
Figura 21: Morfotipos de larvas de taxonomia indeterminada	50
Figura 22: Sedimentos identificados durante a análise microscópica dos coprólitos	51
Figura 23: Vestígio de invertebrados.....	52
Figura 24: Eletroforese em gel de agarose <i>low melting</i> a 3% de ampliações do alvo 12S rDNA para identificação da origem de coprólitos	54
Figura 25: Eletroforese em gel de agarose <i>low melting</i> a 3%, ampliações do alvo 12S para identificação da origem do coprólito	54
Figura 26: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 10/20cm.....	60

Figura 27: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 40/50cm.....	61
Figura 28: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 20/30cm.....	63
Figura 29: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 30/40cm.....	64
Figura 30: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 80/90cm.....	65
Figura 31: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 50/60cm.....	66
Figura 32: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 5/10cm.....	67

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Resultados da análise paleoparasitológica dos coprólitos da GGII analisados neste estudo **45**

Tabela 2: Resultados paleoparasitológicos e paleogenéticos positivos **53**

LISTA DE GRÁFICOS

Páginas

Gráfico 1: Número de coprólitos (N= 80) por setor do sítio arqueológico Gruta do Gentio II, Unaí, MG.....	39
Gráfico 2: Estratigrafia das amostras escavadas em cada setor do sítio arqueológico.	40
Gráfico 3: Diversidade de coloração das amostras por setor	41
Gráfico 4: Tipos de volume das amostras de coprólitos segundo a estratigrafia.	41
Gráfico 5: Número de amostras de coprólitos e tipo de volume em relação ao setor	42
Gráfico 6: Número total de microvestígios encontrados por amostras de coprólitos incluídas no teste de tempo de reidratação.....	43
Gráfico 7: Número de microvestígios encontrados na análise de tempo de reidratação	43
Gráfico 8: Ovos de parasitos encontrados por amostra de coprólitos do sítio arqueológico GGII	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LABTRIP	Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos
PRONAPA	Programa Nacional de Pesquisas Arqueológicas
MG	Minas Gerais
BIOMOL	Biologia Molecular
IFA	Imunofluorescência
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
DC	Doença de Chagas
EPI	Equipamento de Proteção Individual
12S rDNA	gene DNA ribossomal 12S
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
aDNA	DNA ancestral
AD	Anno Domini
AP	Antes do Presente
AC	Antes de Cristo
dNTP	Desoxirribonucleico
pb	Pares de Base
min	Minutos
seg	Segundos
mm	Milímetro
g	Gramma
mg	Miligramma
ml	Mililitro
μl	Microlitro
cm	Centímetro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
U.V.	Ultravioleta
L3	Terceiro Estágio Larvar

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Paleoparasitologia

A Paleoparasitologia, segundo Ferreira, Reinhard e Araújo (1), se estruturou e cresceu na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), apesar de pesquisadores já analisarem parasitos em materiais arqueológicos desde o princípio do século XX. Considerado o precursor da paleopatologia, Sir Marc Armand Ruffer, descreveu em 1909, ovos calcificados de *Schistosoma haematobium* em rins de múmias datadas em 5,200 A.P. (Antes do Presente) (2).

A Paleoparasitologia, foi criada como uma nova linha de pesquisa para recuperar e traçar a origem e evolução das infecções parasitárias, por meio da análise de remanescentes arqueológicos e paleontológicos (3). É considerada como um ramo da Parasitologia e da Paleopatologia. Segundo Araújo e colaboradores (4), na Parasitologia, assume o conceito amplo de parasito que inclui vírus, bactérias, protozoários, helmintos e outros organismos com nicho ecológico em um hospedeiro. A Paleopatologia, disciplina que investiga a saúde das populações do passado, tem como objeto o estudo de evidências primárias depois da morte, como ossos, tecidos calcificados, corpos preservados, múmias e coprólitos (4,5).

O estudos relacionado a coprólitos se inicia no século XIX (6). Informações biomoleculares importantes como o DNA, recuperadas via componentes da dieta e tecidos moles de indivíduos mumificados, auxiliam na recuperação de dados paleoecológicos, palinológicos e de interação entre organismos. A preservação do material acontece por meio de uma completa ou parcial inibição de processos de decomposição do material orgânico, que abrange alterações ambientais de oxigenação, temperatura e/ou pH (7).

Szidat (8) e Pizzi e Schenone (9), foram os primeiros a pesquisar ovos de parasitos em coprólitos nos anos de 1944 e 1954, respectivamente. Posteriormente, técnicas da Parasitologia, como a sedimentação espontânea segundo Lutz, foram aplicadas às análises morfológica, morfométrica, química e de microvestígios em coprólitos. Os achados de ovos de parasitos em material arqueológico, contribuem para um melhor entendimento sobre as infecções parasitárias no passado (10,11). Coprólitos recuperados de escavações arqueológicas e latrinas têm proporcionado a observação de uma grande diversidade de ovos de helmintos preservados,

microvestígios e fitólitos, que podem ser componentes de dieta, fonte para estudos paleoparasitológicos. A boa preservação do material arqueológico, dependerá de condições climáticas apropriadas, como alta temperatura e baixa acidez no solo. Porém, regiões com alta concentração de oxigênio atmosférico e de clima úmido, também possuem potencial para investigações paleoparasitológicas (12).

Os chamados geohelminhos, são parasitos que têm uma fase do ciclo de vida obrigatório no solo, onde as larvas eclodem e atingem o estágio infectante em condições ambientais como temperaturas entre 17-30°C e alta umidade (13). A presença de geohelminhos nas populações pré-colombianas da América, é considerada uma evidência de rotas alternativas de povoamento à via pelo estreito de Bering. A tenacidade dos ovos destes helmintos é diretamente proporcional a capacidade de resistência aos fatores climáticos do meio ambiente. O desenvolvimento da larva, depende de solos mornos, úmidos e sombreados, além do que, não existem registros pré-históricos de infecções ocasionadas por ancilostomídeos e tricurídeos nas regiões árticas da América do Norte (1,14).

No parasitismo, é importante compreender a fisiologia do hospedeiro, utilizado como habitat no ciclo de desenvolvimento do parasito. Fatores como a resposta imune do hospedeiro, conjuntamente com a bioquímica celular, gerando energia metabólica, estão relacionados a interação parasito – hospedeiro (15). O desenvolvimento de estágios de vida livre de uma larva no meio ambiente depende de temperaturas entre 17°C e 30°C, influenciando na distribuição do parasito. Por exemplo, as duas espécies de ancilostomídeos que infectam o homem, possuem distintas tolerâncias ao ambiente, o *Ancylostoma duodenale* possui uma taxa de eclosão larvar de 90% a uma temperatura entre 15°-25°C, enquanto *Necator americanus*, de 20°-35°C. Assim como larvas de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, estes só conseguem atingir seu estágio infectante em um ambiente de solo específico, com baixa umidade e temperatura superior a 20°C (16).

Infecções zoonóticas parasitárias, podem ser transmitidas por meio de fases infectantes de parasitos presentes no meio ambiente, como larvas, esporos de fungos e cistos de protozoários. Estágios de desenvolvimento infectante, podem ser transmitidos via água e alimentos contaminados com fezes contendo parasitos. Juntamente, a prática do consumo de vegetais e carnes cruas ou pouco cozidas, pode aumentar o risco de transmissões relacionados a alimentação (17). Estudos sobre a dieta de populações do paleolítico, relatam que em altas latitudes, o consumo de carnes de caça, principalmente herbívoros, era constante. Em baixas latitudes, o

maior consumo era de vegetais e animais de pequeno porte, incluindo peixes. De um modo geral, frutas e vegetais eram consumidos quando disponíveis (18,19).

Com o advento da agricultura, o aumento de alimentos cultiváveis começou a se tornar expressivo. No Velho Mundo, trigo e arroz, juntamente com outros cereais, possibilitaram o crescimento da população e da energia utilizada. A transição entre populações caçadoras coletoras e agricultoras, ocasionou uma diminuição da robustez e tamanho dos corpos humanos, enquanto marcadores de estresse nutricional, como a hiperosteose porótica, alteração na constituição óssea de principalmente regiões do crânio, aumentaram (20). O comércio de carnes também cresceu, principalmente na metade do século XIX, o que proporcionou um maior consumo de gordura animal (21).

Os primeiros indícios da origem da agricultura no Novo Mundo apareceram no neolítico, entre 9.000 e 4.000 A.P. nas redondezas do México, grupos caçadores-coletores começaram a se unir na estação úmida para praticar a colheita da pimenta e do abacate. Apesar destes grupos ainda apresentarem um caráter nômade na baixa estação, a população se organizou em vilarejos que dependiam muito mais da colheita de alimentos, agora mais diversos, com a presença de milho, abóbora e abobrinha. Somente há 3.500 A.P. que a agricultura começou a de fato se estabelecer na América, com o cultivo de uma maior variedade de leguminosas e raízes tuberosas como a mandioca. A maior disponibilidade de alimentos passou a suprir as necessidades calóricas e nutricionais da população humana, e juntamente com a presença do algodão que possuía uma propriedade têxtil, a agricultura se tornou exclusiva e predominante (22).

Com o objetivo de entender mais sobre o cenário social e ecológico de doenças emergentes desde o paleolítico até a revolução industrial, Barret e colaboradores (23), propuseram uma nova teoria para explicar o advento da agricultura entre as populações humanas, com base na teoria inicial de Omran em 1971 (24). A primeira transição foi relacionada de caçador-coletor para um estilo de vida sedentário, em que a produção de alimento era priorizada. A segunda, com a revolução industrial do século XIX e a terceira com a reemergência de doenças infecciosas (23).

A capacidade de adaptação do homem à vários ambientes o possibilitou de ser encontrado em diversos nichos ecológicos. Como exemplo, a aquisição de parasitos de origem animal, aconteceu por meio da adaptação gastronômica a novas e distintas faunas. A presença de novos parasitos, está comumente relacionada ao aumento das práticas agrícolas, domesticação de animais e acúmulo de dejetos (25).

No Novo Mundo, nativos americanos se expuseram a uma grande variedade de parasitos zoonóticos, por meio do grande contato com animais silvestres. A maioria das espécies parasitárias encontradas em sítios arqueológicos da América, são de potencial zoonótico (23,25). Ainda, segundo Reinhard e colaboradores (25), a prática alimentícia de carnes malcozidas e ingestão de pequenos animais, permaneceu mesmo depois do advento da agricultura na América do Norte, onde 80% dos sítios arqueológicos pré-agrícolas e 50% dos sítios arqueológicos pós-agrícolas, mostraram fragmentos de ossos de pequenos animais, expondo os humanos a infecções diretas e indiretas. Diferente do Velho Mundo, onde as infecções parasitárias começaram a aumentar a partir da domesticação de animais e aglomeração populacional (25).

Durante o período das grandes navegações, iniciado no século XV, europeus trouxeram para indígenas americanos, vírus e bactérias localizados no Velho Mundo (26). No fim do século XIX, a parasitologia e às migrações humanas pelo globo, já despertavam o interesse de pesquisadores, o que coopera para a teoria de vias alternativas migratórias para o povoamento das Américas. Achados paleoparasitológicos, mudaram as concepções previamente aceitas sobre a origem de infecções no Novo Mundo (27).

O Estreito de Bering, era considerado a única rota de entrada do homem e seus parasitos nas Américas. Araújo e colaboradores (1), propõem que os parasitos humanos adquiridos pela via filogenética, via que relata a origem de parasitos humanos por meio da hereditariedade com outras espécies de primatas (28) ao longo da evolução de hospedeiros filogeneticamente próximos ao homem, têm acompanhado as migrações humanas pelo planeta. Entretanto, a presença de ancilostomídeos, *T. trichiura* e *Strongyloides stercoralis* em coprólitos humanos de sítios americanos pré-colombianos, não pode ser facilmente justificada pela passagem no Estreito de Bering, já que o ciclo biológico destes parasitos não se sustentaria nas temperaturas extremamente baixas da Beríngia (3,14,29).

1.2 A Paleogenética

A paleogenética tem como fonte de estudo o DNA antigo (aDNA), contribuindo com informação genética não só do parasito, como também do hospedeiro, da dieta e do entorno ambiental (30). Resultados paleogenéticos de parasitos e de seus hospedeiros humanos, têm contribuído com o entendimento da origem e a epidemiologia de infecções que acometeram populações em períodos passados (30–32).

Era assumido que em circunstâncias naturais, o DNA degradaria rapidamente logo após a morte e só seria preservado em condições excepcionais, como em múmias e materiais conservados em *permafrost*, camada geológica composta de terra, rocha e gelo. Com o advento de técnicas moleculares como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), diversos estudos em materiais de tecidos duros como ossos e dentes, demonstraram não existir uma datação limite predeterminada para a recuperação do aDNA. O termo aDNA (*ancient DNA*), que designa fragmentos de DNA encontrados em material biológico fossilizado e preservado, é relevante para o estudo de diversas disciplinas como arqueologia, ciência forense, paleontologia, genética de populações, taxonomia e zoologia (33).

Uma das primeiras recuperações de aDNA em material arqueológico, foi proveniente de uma espécie de zebra extinta há 150 anos, conservada em acervo museológico (34). Pääbo (35), demonstrou a clonagem de 3400 pares de bases recuperados de uma múmia egípcia datada em 4.550 A.P. Não só a PCR, mas diversas técnicas como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), IFA (Imunofluorescência), MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão), e MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), foram empregadas para recuperar informações sobre populações do passado e seus parasitos (36,37).

Para que estas técnicas sejam empregadas, é necessário que o material esteja viável para análise. Condições e tempo de preservação depois da escavação e coleta, são primordiais para preservar o aDNA e evitar deterioração. Após a coleta, é necessária a preservação imediata do material. O uso de EPI's (Equipamentos de Proteção Individual) para cada material é utilizado com o objetivo de evitar contaminação entre amostras ou com DNA moderno. A amostra arqueológica deve ser manipulada com materiais e ferramentas estéreis, protegida da luz e mantida em baixas temperaturas (37,38).

A abordagem de códigos de barras de DNA ou “*Barcoding DNA*”, aplica marcadores genéticos com o objetivo de discriminar e identificar espécies biológicas como plantas, fungos e animais. Dentre as contribuições desta abordagem, podem-se citar: Avanços na tecnologia biomédica com o reconhecimento de parasitos e vetores, na área ambiental, com detecção de espécies em perigo de extinção e na agricultura, permitindo uma maior eficiência no controle de pestes (39). Os dados gerados via *Barcoding DNA*, são corroborados com resultados apresentados por taxonomistas na descrição de novas espécies e estudos de estágios evolutivos de um mesmo organismo. Assim como a identificação de clados, relações evolutivas e reconstrução de árvores filogenéticas que auxiliam na discriminação de espécies crípticas (39).

Apesar da dificuldade de se recuperar curtos fragmentos de DNA com um número reduzido de cópias, os estudos de aDNA, proporcionam novos dados sobre aspectos paleoecológicos do passado, com informações sobre paleofauna, microbiomas orais ancestrais, paleodietas e paleoambientes (40). Juntamente com identificação de parasitos e hospedeiros em diversos materiais, incluindo coprólitos (41–43).

O fenômeno parasitismo surgiu desde o início da vida na Terra. Não há organismo que não seja parasitado, portanto, existe uma grande diversidade de parasitos que sob a influência de processos evolutivos, resultaram nas espécies que parasitam os hospedeiros atuais (44). Estudos filogenéticos, mostraram associações persistentes entre espécies de parasitos e hospedeiros com padrões de coevolução. Análises paleoparasitológicas, demonstram a presença de parasitos em material arqueológico e paleontológico, o que contribuiu para estabelecer relações filogenéticas dos parasitos e situar temporalmente o início das relações parasito-hospedeiro (45).

Recentemente, com a aplicação das técnicas da fronteira do conhecimento em paleogenética, novas evidências de contatos transpacíficos pré-colombianos foram encontradas. Moreno-Mayar e coautores (46) descreveram um possível evento de mistura genética entre nativos da América e a população Rapa Nui. Os cientistas reportaram informação genética de Nativos Americanos por meio de análise genética de marcadores de 27 nativos de Rapa Nui. O estudo estabelece um contato transpacífico entre 1280-1425 Anno Domini (A.D.), muito antes da data em que a Europa acreditava ter encontrado a ilha, por volta de 1722 A.D. Da mesma maneira, a análise de genomas completos de dois indígenas Botocudos do Brasil, demonstrou

informação genética de indivíduos polinésios, situando um contato transpacífico muito antes do que a história reporta (47).

Iñiguez e colaboradores (42) recuperaram aDNA de *Enterobius vermicularis* em coprólitos humanos de populações pré-colombianas das Américas, o oxiúro possui uma longa história evolutiva com o homem. Uma linhagem do parasito detectada num sítio único da costa de Chile, diferente à encontrada nos outros sítios arqueológicos da América do Norte e do Sul, assim como nas populações atuais, reascendeu a hipótese de um evento de introdução alternativa do parasito nas Américas (31).

1.3 O Sítio Arqueológico Gruta do Gentio II

O sítio arqueológico Gruta do Gentio II (GGII), foi identificado em 1973 pela equipe do Instituto de Arqueologia Brasileira (IAB) como parte do Programa Nacional de Pesquisas Arqueológicas (PRONAPA), quando este abrangeu os municípios de Unaí e Paracatu. O sítio GGII está localizado dentro da fazenda Vargem Bonita no município de Unaí, MG e é associado a um paredão de calcário de 2,5km de altura. A área interna apresenta 200m² com abrigos e pequenas grutas, caracterizadas pela presença de diversos vestígios humanos, vegetais e animais. Os sucessivos desmoronamentos ao longo dos anos, acumularam rochas no salão principal, que não dispunha de um espaço muito amplo para a permanência de animais (48).



Figura 1: Imagem do Interior do Sítio Arqueológico GG II durante as escavações em 1976. Fonte: Sene, 2007.

Segundo Sene (48), houveram quatro expedições de escavação no sítio, em 1976, 1977, 1984 e 1987, com a sondagem inicial em 1973. O sítio é constituído por dois horizontes de subsistência bem definidos, o de caçador-coletor (12.000 a 7.295 +/- 150 A.P.), com vestígios líticos e restos alimentares, e o horticultor (3.490 +/- 120 a 410 +/- 60 A.P.), mais recente, associado a uma ocupação de ceramistas onde foram encontrados os exemplares arqueológicos mais antigos da tradição ceramista Una. No total, 140m² do sítio foi decapado, e os estratos escavados subdivididos em quatro camadas principais:

IV - A mais antiga, datada em 10.190 +/- 120 A.P. Representa o horizonte caçador-coletor mais profundo, com coloração marrom escura e espessura de 10 cm.

III - Camada intermediária, ainda representativa do horizonte caçador-coletor, com datação entre 8.595 +/- 215 e 9.040 +/- 70 A.P., possui coloração avermelhada e vestígios de carvão.

II - Camada mais recente representante do horizonte caçador-coletor, também possui coloração avermelhada. A região superior representa uma região de abandono, possui quatro datações distintas entre 7.295 +/- 150 e 8.125 +/- 120 A.P., as demais datações são superiores a 8 mil anos.

I Inferior – Primeira porção da camada mais recente, associada ao horizonte horticultor. Possui desmoronamentos pontuais e grande quantidade de vestígios culturais, com datação de 3.490 +/- 120 A.P.

I Superior – Segunda porção do horizonte horticultor, possui coloração acinzentada e 30 cm máximo de espessura, com grande quantidade de vestígios culturais. Datações entre 1.820 +/- 75 e 410 +/- 60 A.P.

Entre os dois horizontes de subsistência, durante um intervalo de 3.500 anos, o sítio sofreu um período de abandono, caracterizado pela ausência de vestígios humanos e carvão. Adicionalmente, pinturas rupestres foram observadas no interior, com figuras antropomorfas, zoomorfas e geométricas. Dos sítios arqueológicos do município de Unaí, GGII foi o único sítio que apresentou gravuras, mesmo simples, esquemáticas, com traços finos paralelos ou entrecruzados. Dentre as pinturas identificadas, cervídeos, felinos, lagartos, aves e outros animais diversos foram descritos, distribuídos nas poucas composições. Gotas de tinta nos solos escavados foram identificadas em estratos arqueológicos abaixo de camadas com datações superiores a 10 mil anos (Comunicação Pessoal Dr. Paulo Seda) (49,50).

Nem todas as camadas ocorrem na extensão total do sítio. De forma geral, o espaço se apresenta em relevos horizontais ou bastante inclinadas, com presença de

blocos de calcário e perturbações ambientais que podem estar relacionadas aos enterramentos. As camadas estão distribuídas de forma heterogênea em toda extensão da gruta, com ocorrência de maiores ou menores quantidades de camadas em cada setor (49).

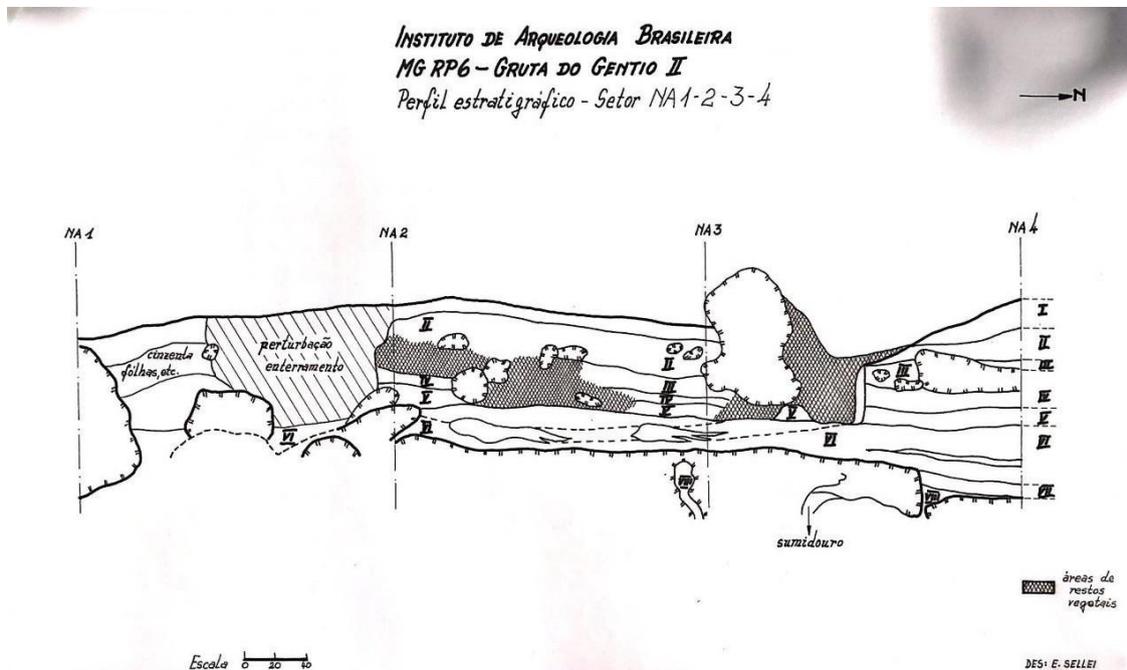


Figura 2: Imagem de um corte transversal da disposição das camadas inseridas nos setores NA1, NA2, NA3 e NA4. Fonte: Arquivo IAB.

Segundo Costa (51), estudos de registros líticos do sítio arqueológico, detectaram a presença de rochas como o sílex, que possuem potencial para a confecção de armas brancas e faíscas. A escolha da matéria prima acompanhou o desenvolvimento da GGII, com uma mudança na abundância e qualidade de compostos líticos durante os dois horizontes culturais. Testes de atividade magnéticas por meio de um sensor magnético sensível chamado SQUID (*Superconducting Quantum Interference Devices*), foram realizados com o objetivo de entender a constituição das amostras. Foi possível observar que certas rochas tinham passado pelo processo de tratamento térmico, que inclui a exposição à altas temperaturas antes do lascamento do material (51).

Durantes as expedições conduzidas pelo IAB, além de remanescentes ósseos de humanos e animais, enterramentos e vestígios alimentares, coprólitos isolados, sem associação arqueológica da possível origem foram identificados em diversas camadas estratigráficas. A caverna possui um microclima que propiciou a mumificação natural de corpos, com um grande número de enterramentos nos dois

horizontes culturais. O sítio arqueológico foi caracterizado como cerimonial e cemitério (52).

Estudos paleobotânicos também realizados durante as escavações, demonstraram compostos de aproximadamente 14.048 espécies, incluindo abóboras, amendoins, milhos (bem conservados e em diversos estágios de domesticação), tubérculos, grãos, algodão e diversas outras plantas. Vestígios de cestaria complexas também foram encontrados nas camadas mais superficiais, junto à plumas, adornos, conchas e cerâmicas simples, condizentes da tradição Una (49,53).

A Tradição denominada Una, apresenta uma das cerâmicas mais antigas do Brasil, possivelmente originada na Amazônia. Possui quatro fases, a Una localizada no litoral do Rio de Janeiro, Mucuri e Piumhy encontradas no Cerrado brasileiro, e a Tangui que é encontrada na serra capixaba. A tradição se inicia na GGII, Noroeste de MG por volta de 3.500 anos A.P., e se expande por todo o Sudeste. Atinge o sul de MG, o norte de São Paulo, a Serra Fluminense, a Baixada de Campos, o litoral do Rio de Janeiro e, por fim, a serra e o litoral do Espírito Santo (53–55).

Esta Tradição se caracteriza pela técnica de uma morfologia cerâmica peculiar, assim como, por específicos padrões de sepultamentos (56). Ocupantes da gruta eram portadores de uma cerâmica pequena, tecnologicamente acabada, submetida a queima redutora, ou seja, realizada sem a presença de oxigênio (54) e com alguma decoração.

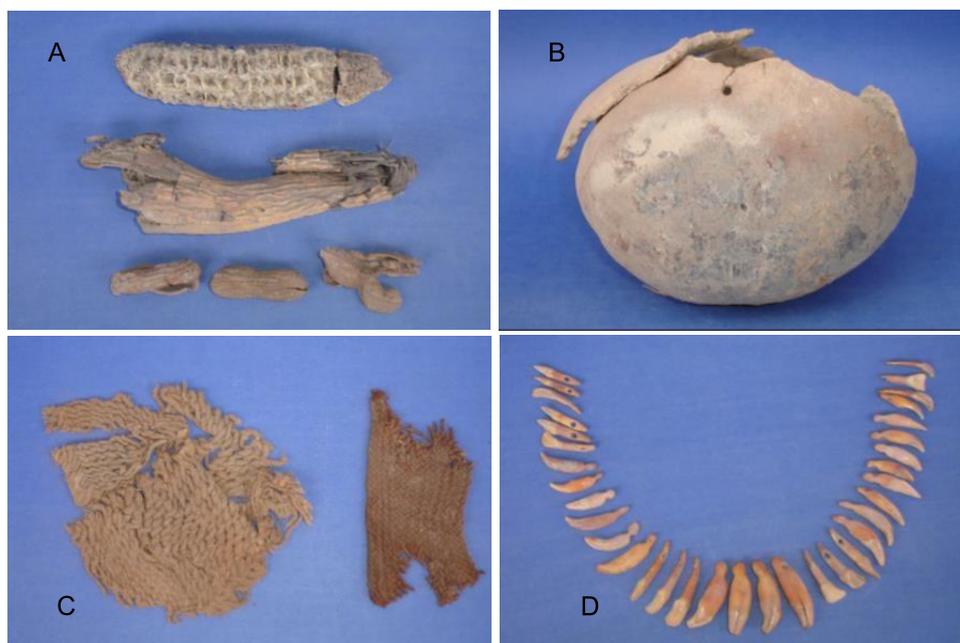


Figura 3: Vestígios humanos encontrados durante as escavações do Sítio Arqueológico Gruta do Gentio II. A- Milho, tubérculo e amendoim. B- Cabaça. C- Tecidos D- Colar de dente de macaco. Fonte: Sene, 2007.

No sítio GGII, foram escavados ao todo 95 enterramentos e 176 indivíduos, distribuídos entre as camadas dos dois horizontes de subsistência. No horizonte caçador-coletor, os remanescentes humanos foram encontrados em 26 enterramentos (n=38 indivíduos), 7 masculinos, 4 femininos e 27 indeterminados, incluindo 13 crianças. No horizonte horticultor, foram 69 enterramentos, (n=138 indivíduos) com uma boa representação de cada sexo (29 masculinos e 26 femininos) e 83 indeterminados, a maioria crianças e adolescentes. Ossos de animais de várias espécies também foram escavados, associados aos enterramentos ou a locais de fogueira, assim como possíveis restos alimentares de mamíferos da fauna local, juntamente com peixes e resquícios malacológicos (53).

1.4 Justificativa

Desde que o sítio arqueológico foi objeto de muito estudo, por ser o primeiro e com mais informações da tradição Una, o presente trabalho tem como objetivo principal aumentar nosso conhecimento acerca da dispersão das infecções parasitárias, composição parasitária da fauna local e identificação genética da origem de coprólitos, com abordagem de "*Barcoding DNA*", utilizada para identificação de diversas espécies de táxons. Os dados genéticos corroboram com estudos morfológicos e morfométricos da caracterização de coprólitos, já que apesar de serem descritivos, não proporcionam um resultado específico sobre origem da amostra arqueológica.

A catalogação dos coprólitos para a construção de um banco de dados, assim como dados temporais e espaciais sobre a presença e distribuição de materiais em várias camadas estratigráficas distintas, contribui com informações para a interpretação dos resultados em indivíduos infectados que, juntamente com as análises paleoparasitológicas, paleogenéticas e arqueológicas, ajudam a formular hipóteses sobre a distribuição das infecções parasitárias e seus hospedeiros no passado.

A integração da paleoparasitologia e a paleogenética, se apropriando também do estado da arte da parasitologia, genética e epidemiologia, resulta em um desenho de um panorama paleoepidemiológico mais abrangente e informativo. Esta proposta almeja investigar as infecções parasitárias intestinais em um sítio arqueológicos da tradição Una, para obter uma perspectiva diacrônica das infecções parasitárias, e

ainda contribuir com informações sobre a dinâmica da transmissão dos parasitos e origem de materiais, como os coprólitos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer, com a integração da análise Paleoparasitológica e Paleogenética, um panorama das infecções parasitárias por helmintos com base na análise de ovos de parasitos em coprólitos provenientes do sítio arqueológico pré-colombiano Gruta do Gentio II (12.000 a 410 +/-60 A.P.).

2.2 Objetivos Específicos

1. Aplicar um sistema de classificação morfológico de coprólitos para a identificação da origem animal ou humana;
2. Determinar o perfil paleoparasitológico de humanos e animais por meio da técnica de concentração parasitária de Lutz e microscopia de luz de campo claro;
3. Determinar a origem dos coprólitos pela análise paleogenética por meio da abordagem de “*DNA Barcoding*”;

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Medidas para a análise paleogenética

Amostras biológicas de coprólitos, provenientes do sítio arqueológico GGII foram analisadas segundo os procedimentos paleogenéticos para evitar contaminação, como descrito por Iñiguez (37). O material foi analisado no laboratório de paleogenética (LP/LABTRIP/IOC), geograficamente distante do laboratório de processamento de material moderno (BIOMOL/LABTRIP). O mesmo possui um controle rígido de pessoas e uma antessala para a vestimenta de todos os EPI's necessários: jaleco, máscara, pró pé e touca. Seu interior é subdividido em pequenas salas específicas para a preparação e extração do material, assim como os procedimentos de PCR.

O LP é limpo pelos próprios operadores semanalmente. A descontaminação de superfície metálica é feita por meio de álcool 70% e a de superfície não metálica por hipoclorito de sódio à 1%, seguidos pela irradiação por luz U.V. durante 15 minutos na cabine ou na capela a serem utilizadas. Todo o material utilizado (placa de petri, gaze, funil de decantação, cálice de vidro e bastão de vidro), foi previamente esterilizado por meio de autoclave e irradiado com luz U.V. por 15 minutos. Visando as medidas de autenticação de resultados na pesquisa paleogenética, para controlar a contaminação do aDNA com DNA moderno e a contaminação cruzada, ou mesmo resquícios de microvestígios associados a superfície, para cada coprólito, foi utilizado um material específico e individual (37).

3.2 Coleta

Um total de 80 coprólitos foram coletados para o presente estudo. A coleta paleogenética do material arqueológico foi conduzida pela equipe do LP do LABTRIP, IOC, no IAB nos meses de novembro de 2016 e fevereiro de 2017. As amostras permaneceram armazenadas na Paleoteca de remanescentes humanos e animais do LP, sob a responsabilidade da Dra. Alena M. Iñiguez, localizado no LABTRIP/IOC.

A coleta paleogenética que é utilizada tanto no sítio arqueológico como no acervo museológico, considera dois aspectos: (A) a preservação da amostra imediatamente após a escavação/seleção, em materiais estéreis e inertes, protegidas da luz e em baixas temperaturas; (B) Evitar ao máximo o contato da amostra com o operador durante a coleta, onde é essencial que, o arqueólogo ou o geneticista, faça uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs), jaleco, luvas, toucas, sapatilhas e máscaras descartáveis, com o propósito de evitar a contaminação/perturbação do sítio/acervo, indivíduos ou amostras (37).

Os coprólitos foram submetidos a três procedimentos laboratoriais, o registro morfológico e morfométrico por meio de uma ficha de dados de classificação de coprólitos, a análise paleoparasitológica utilizando microscopia de luz e a análise paleogenética, com o objetivo de identificar a proveniência das amostras.

3.3 Sistema de classificação de coprólitos

Para um registro padronizado e completo sobre todas as informações macroscópicas dos coprólitos, foi construído um banco de dados (Excel 2013)

seguindo a ficha de dados de classificação de coprólitos, proposta por Jouy-Avantin e colaboradores (57) (Figura 4). Informações detalhadas das análises microscópicas (dieta e identificação parasitária), análise da coloração do coprólito no ambiente e após a reidratação e análise molecular, juntamente com o registro dos vestígios encontrados no sítio arqueológico, como pegadas e moradia de animais, contidos na ficha descritiva, foram catalogadas.

A ficha de dados foi dividida em cinco tópicos. O primeiro detalha o registro de tempo cronológico, e informações da localização dos coprólitos no interior de GGII. O segundo tópico leva em consideração os diferentes atributos da morfologia externa do material. O terceiro, detalha a macroanálise descritiva do interior das amostras. O quarto, considera todas as análises paleogenéticas, paleoparasitológicas e outras que dão suporte à identificação da origem dos coprólitos. E o quinto, conclui com a integração de dados que identifica a origem do material.

Adicionalmente, os autores (57) indicam uma ficha de referência de atributos a serem considerados para o preenchimento da ficha de dados de classificação de coprólitos. À exemplo, uma das opções da chave descritiva é a forma das extremidades dos coprólitos, que podem ser descritas como: Redondo (RD), Pontudas (PT) ou Quebrado (QB) (Figura 5).

LOCALIZAÇÃO

Sítio	Nome do Investigador	Data
Profundidade Arqueológica	Setor	Data do Estrato (AP):
Coordenadas x,y,z	Número de Identificação	

DESCRIÇÃO EXTERNA

Coloração	Estado de preservação	
Volume	Constrições	
Extremidade	Espessura (mm)	
Comprimento (mm)	Peso (g)	
Largura (mm)	Inclusões	Modificação Tafonômica

DESCRIÇÃO INTERNA DO COPRÓLITO

Textura	Dureza	Coloração
---------	--------	-----------

CONTEÚDO DO COPRÓLITO

Macrocompostos

Vegetais
 Fauna
 Microcompostos
 Palinologia
 Paleoparasitologia
 Biologia Molecular

IDENTIFICAÇÃO ZOOLOGICA

Figura 4: Ficha de dados de classificação de coprólitos. Fonte: Jouy-Avantin e colaboradores (2003), versão modificada e traduzida.

Atributos	Características	Abreviação
Cor Externa do Coprólito	De acordo com o <i>Munsell Soil Chart</i>	
Estado de Preservação	Coprólito inteiro	E1
	O coprólito pode ser restaurado com x fragmentos	Ex
	O coprólito consiste em um único isolado	F1
	O coprólito não pode ser restaurado com x fragmentos	Fx
Volume	Cilíndrico	CI
	Esférico	ES
	Cônico	CO
	Achatado	AC
	Complexo	CX*
Constrições	Anotar o número de constrições	
Formato das Extremidades	Redondo	RD
	Pontudo	PT
	Quebrado	QB
Comprimento, Altura e Espessura	Medida em milímetro	
Peso	Medida em grama	
Modificações Tafonômicas	Buracos	BR
	Vacúolo	VA
	Fissuras	FI
	Ausência	AU
Inclusões	Osso	OS
	Dente	DT
	Vestígio de insetos	VI
	Cabelo	CB
	Pena	PN
	Conchas	CH
	Sementes	SE
	Pedras	PD
	Carvão	CV
	Vestígio vegetal	VV
	Vestígio indeterminado	VI
	Ausência	AU
	Textura	Homogênea
Agregados compactos > 1		AGG

	Agregados compactos < 1	agg
	Mistura Homogênea com alguns agregados	H/A
	Muitos agregados em uma mistura homogênea	A/H
Dureza	Quebradiça	QB
	Dura	DR
Cor Interna do Coprólito	De acordo com o <i>Munsell soil chart</i>	

Figura 5: Ficha de referência de atributos do sistema de classificação de coprólitos, versão modificada e traduzida. * - Modificado para este estudo (de Indeterminado para Complexo).

Como critérios de seleção, o fragmento de maior representatividade foi escolhido segundo: (1) Maior peso (2) Maior tamanho. Posteriormente a similaridade quanto a morfologia e morfometria descritos por Chame e colaboradores (58) foram levados em consideração. Este estudo é uma *checklist* morfométrica e descritiva de fezes de mamíferos terrestres.

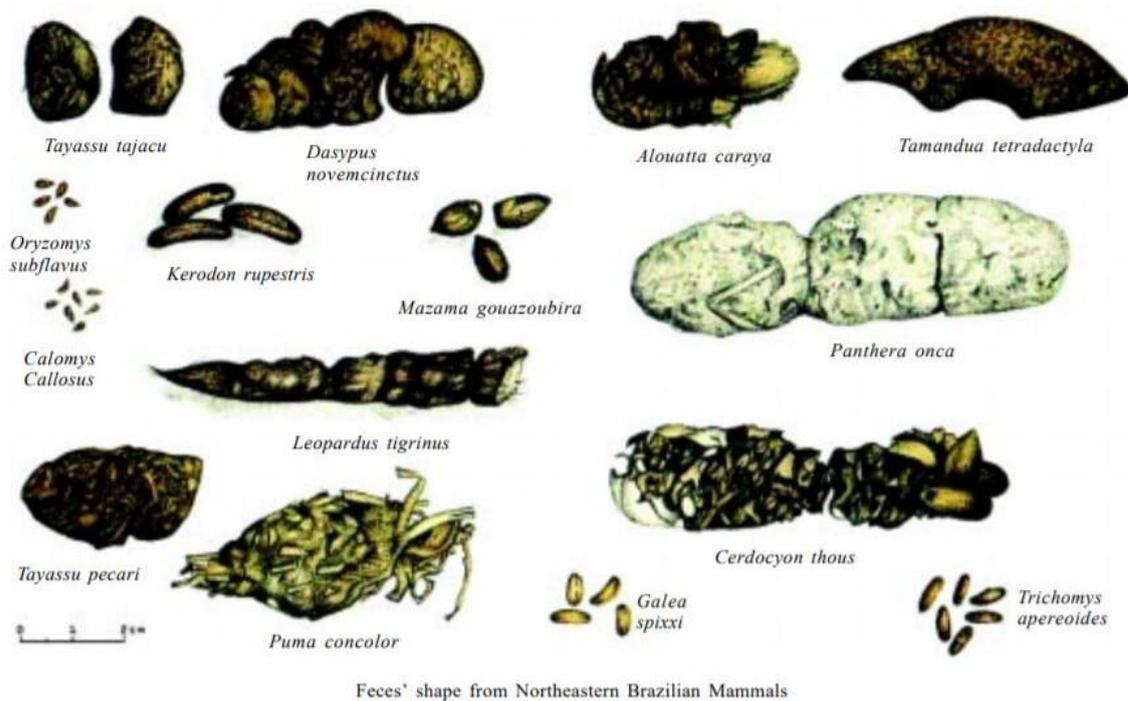


Figura 6: Imagem de fezes de mamíferos terrestres do nordeste brasileiro, Fonte: Chame e colaboradores (2003).

As análises de identificação de cor, foram realizadas segundo um *Munsell Soil Chart* (59) como recomendado por Jouy-Avantin e colaboradores (57).

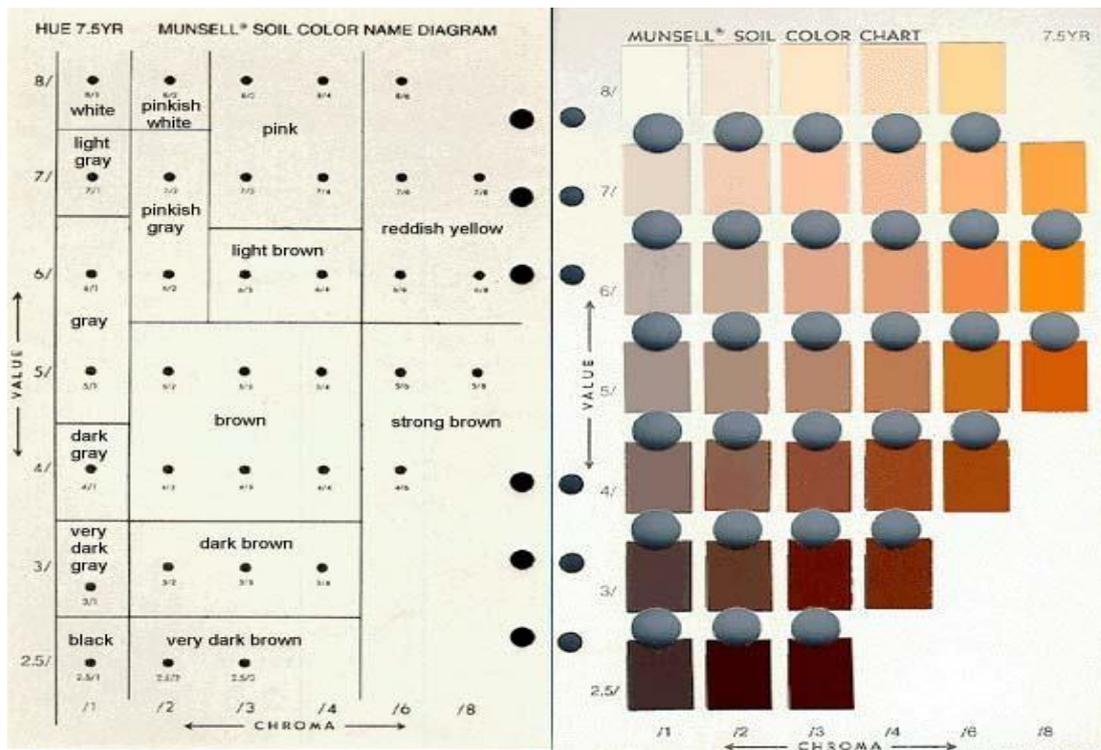


Figura 7: Representação do *Munsell Soil Chart* utilizado como referência para a identificação das cores tanto internas quanto externas dos coprólitos neste estudo. Fonte: *Munsell Color* 1975.

3.4 Análise Paleoparasitológica

Os coprólitos foram raspados em todas as superfícies e posteriormente irradiados com luz U.V. durante 15 minutos. Após descontaminação externa, os fragmentos foram pesados em balança analítica (QUIMIS modelo BG1000) e submetidos a técnica de reidratação segundo Callen e Cameron (60). O material foi submergido na solução aquosa de fosfato trissódico (Na_3PO_4) a 0,5% por 48h, e posteriormente macerado com ajuda de um cadinho de porcelana ou bastão de vidro.

O coprólito reidratado foi submetido à técnica de concentração parasitária de sedimentação espontânea segundo Lutz (61). A técnica consiste na sedimentação do material fecal em solução durante 2h após filtrado por gaze em funil de decantação.

Deste modo, ovos e larvas presentes no material analisado, irão se depositar por gravidade na parte inferior do cálice, o que foi denominado neste estudo como sedimento fecal.

Uma alíquota de 200 μl de sedimento fecal de cada amostra, foi separada para a análise paleoparasitológica e 200 μl para a análise paleogenética. Foram confeccionadas e analisadas lâminas para a visualização em microscópio de luz (PHYSIS) nas objetivas de 10X, 40X e 100X. Os dados morfométricos foram

registrados e fotografados em microscópio (ZEISS modelo AXIOPLAN). Na preparação das lâminas, foram utilizados aproximadamente 20µl de amostra e 20µl de glicerol 100%. A identificação foi feita com base na morfologia e morfometria de ovos de parasitos segundo Coura (13) e Roberts (62). Além da procura por parasitos, foram também levados em consideração achados de vegetais, grãos de pólen, fungos e microvestígios comumente encontrados em remanescentes arqueológicos.

3.4.1 Teste de tempo de reidratação

Devido aos longos períodos de reidratação, a ausência de conservantes, pode promover a proliferação de bactérias e fungos que afetam os procedimentos paleogenéticos. Amostras (n=7) foram submetidas aos tempos de reidratação de 24h, 48h e 72h. Posteriormente na microscopia de luz de campo claro se aplicou o menor tempo, que proporcionou a recuperação de mais estruturas para todo o estudo.

3.4.2 Análise morfológica e morfométrica de ovos de parasitos

Na caracterização morfológica e morfométrica dos ovos de parasitos helmintos encontrados no interior dos coprólitos, foram levados em consideração a morfometria e a morfologia, incluindo a estrutura externa, especificamente no caso dos ovos de capilarídeos. Comprimento e largura foram medidos em todos os exemplares (Figura 8). Nos diferentes morfotipos de ovos de capilarídeos, foram acrescentadas medidas de comprimento e largura dos *plugs* polares nas extremidades.



Figura 8: Imagens dos dados morfológicos e morfométricos considerados na análise dos ovos de parasitos neste estudo A: plano externo de um ovo de capilarídeo com a ornamentação estriada sinalizado pela seta (100x). B: Medidas de 1: Comprimento - 76.923 μ m, 2: Largura 30.312 μ m, 3: Largura opérculo: 9.739 μ m. 4: Comprimento opérculo 7.192 μ m.

3.5 Análise Paleogenética

Aproximadamente 200 μ l de sedimento de coprólitos foram submetidos à extração de aDNA por meio do kit *QIAmp DNA Investigator* (Qiagen), com modificações para a digestão física utilizando nitrogênio líquido e digestão química com Proteinase K a 20mg/mL (Promega). Foram incluídos controles negativos da extração para cada seis amostras. Todas as superfícies e equipamentos foram descontaminados antes da sua utilização. Controles positivos não foram incluídos para diminuir o risco de contaminação das amostras. O critério de autenticidade inclui a ausência de pPCRs (Produtos de PCR) detectáveis no controle negativo da extração e da PCR. A detecção da concentração de aDNA foi estimada em espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (37).

Para a determinação da origem de cada coprólito, foram utilizados os iniciadores FA1 e FA2 na detecção do alvo 12S rDNA mitocondrial de 215 pb, segundo as condições descrita por Kitano e colaboradores (63). A reação da PCR com volume final de 25 μ l, continha 2U de *GoTaq G2 Hot Start*, 1X de tampão, 3mM de MgCl₂, 0,4mM de dNTP e 1 μ M de cada iniciador. A ciclagem consistiu em 95°C por 3 min, com 45 ciclos de 30 seg a 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, com uma extensão de 10 seg a 72°C. As reações foram submetidas ao termociclador *SimpliAmp™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Os processamentos de eletroforese, sequenciamento de DNA e análise dos resultados foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular, que processa material moderno (LABTRIP/IOC/FIOCRUZ), situado em prédio geograficamente distante do LP/LABTRIP, com o objetivo de evitar a contaminação do material arqueológico com pPCRs. As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose *Low Menting* a 3% (Invitrogen), marcador de peso molecular ladder 50pb (Ludwing) e corante *Gel Red* a 1% da (BIOTIUM). Para a purificação dos pPCRs, foram utilizados os kits: *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen) e *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega).

No sequenciamento nucleotídico foi utilizado o kit *Big Dye Terminator* v 3.1 (Applied Biosystems) e sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems) da Plataforma de Sequenciamento/Fiocruz. As sequências foram editadas com os programas SeqMan v.7.00 (DNASTAR) e BioEdit v.704, comparadas com a ferramenta Blast/NCBI, utilizada para comparar as sequências obtidas no estudo com as sequências genéticas depositadas no banco de dados internacional de sequências, *GenBank*. Posteriormente as sequências obtidas e comparadas, foram depositadas no *GenBank*.

3.6 Análise integrada de resultados do Sítio Gruta do Gentio II

Para entender os resultados das análises do presente estudo em relação à base arqueológica do sítio GGII, foram construídos diagramas dos setores representativos para cada estrato arqueológico. Foram integrados os resultados positivos para a presença de parasitos, a identificação da origem dos coprólitos e os atributos do sítio, como entrada da gruta, fogueira e enterramentos humanos. Como demonstrado no exemplo da Figura 9.

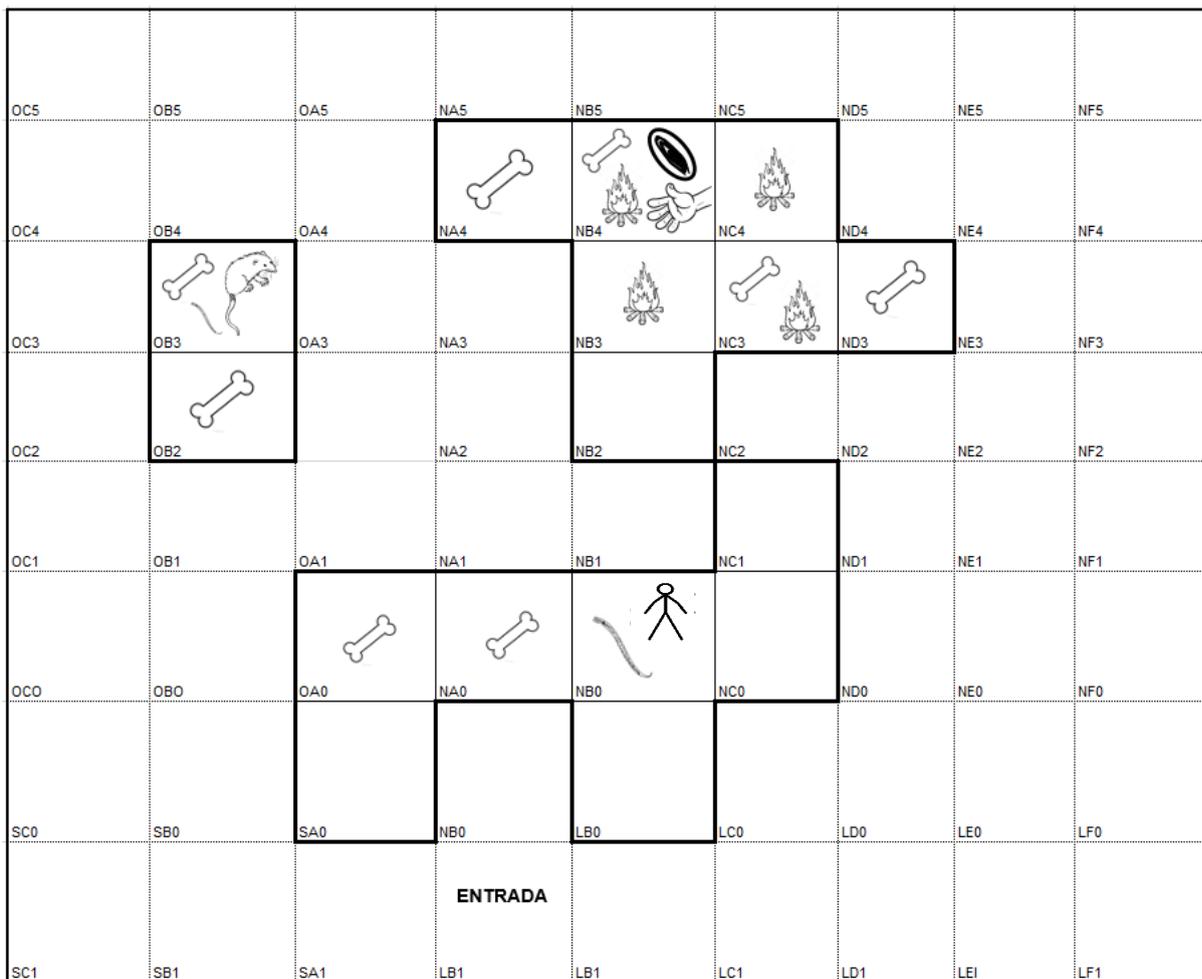


Figura 9: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 20/30cm.

-  – Ovo de *Trichostrongylus* spp.
-  - Enterramento humano.
-  - Fogueira
-  - Representação de marsupial segundo a paleogenética
-  - Representação de humano segundo a paleogenética

4. RESULTADOS

Um total de 80 coprólitos e seus 669 fragmentos foram catalogados segundo a ficha de dados de classificação de coprólitos. Na análise paleoparasitológica, também foi examinado o número total de amostras.

Neste estudo, a análise paleogenética para determinação da origem dos coprólitos foi restrita a uma seleção total de 19 amostras, segundo os critérios: 1) positividade na análise paleoparasitológica (n=17) e 2) morfologia de coprólito representativa com volume cilíndrico ou esférico (n=2).

Do total de 72 setores do âmbito arqueológico, 16 constavam com a presença de coprólitos. Nestes foram analisados a geografia total do sítio arqueológico, juntamente com os estratos, volume e coloração, representados por meio de gráficos (Gráficos do 1 ao 5). Dos 16 setores avaliados, 6 apresentaram positividade para a presença de ovos de parasitos intestinais, 7 apresentaram microvestígios como vegetais, larvas e fragmentos de invertebrados, e todos apresentaram grãos de pólen.

4.1 Análise da ficha de dados de classificação de coprólitos

A identificação da origem dos coprólitos (n=80) foi conduzida pela análise de atributos internos e externos descritos na ficha de dados como exemplificado para os resultados da amostra GG01 (Figura 10). As informações de um total de 669 fragmentos de coprólitos provenientes de 16 setores, apresentaram 10 padrões de cores, 4 tipos de volumes e em 11 estratos de profundidade.

GG01 -

LOCALIZAÇÃO

Sítio: Gruta do Gentio II Nome do Investigador - Data: 09/02/1987
Profundidade Arqueológica: 10/20cm Setor: ND3 Data do Estrato (AP): -
Coordenadas: 16° 15'S / 46° 02' W Número de Identificação: -

DESCRIÇÃO EXTERNA

Coloração: 5/2 Estado de preservação: F₃
Volume: CX Condições: 2
Extremidade: BR/BR Espessura (mm): 69mm
Comprimento (mm): 127mm Peso (g): 21,4828g
Largura (mm): 109mm Inclusões: VV Modificação Tafonômica: AU

DESCRIÇÃO INTERNA DO COPRÓLITO

Textura: agg Dureza: DR Coloração: 5/2

CONTEÚDO DO COPRÓLITO

Macrocompostos

Vegetais: AUSÊNCIA

Fauna: AUSÊNCIA

Microcompostos

Palinologia: PRESENÇA

Paleoparasitologia: PRESENÇA, 1 ovo de capilarídeo

IDENTIFICAÇÃO ZOOLOGICA

Panthera onca (onça-pintada): Análise paleogenética alvo 12s rDNA



Figura 10: Ficha de dados de classificação de coprólitos da amostra GG01.

Os coprólitos selecionado e classificados segundo Chame e colaboradores (58) (Figura 11 e 12) são: Amostras GG01 (Figura 10) e GG38 (Figura 11), que possuem morfologia e morfometria similar as fezes da ordem Carnívora. As amostras GG15, GG35, GG43, GG51 e GG74 possuem morfologia e morfometria similares com os registrados em fezes de marsupiais, primatas, tatus (*Dasypodidae: Xenarthra*), gado doméstico, bisão, búfalo (GG 35, GG43, GG51) e de primatas ancestrais e humanos (GG74) (Figura 11).

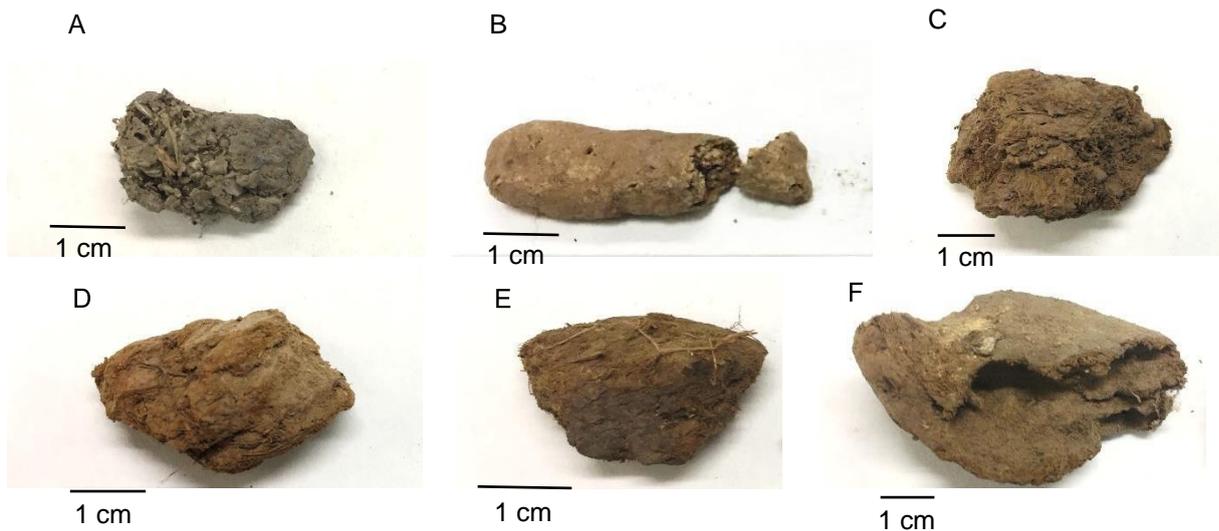
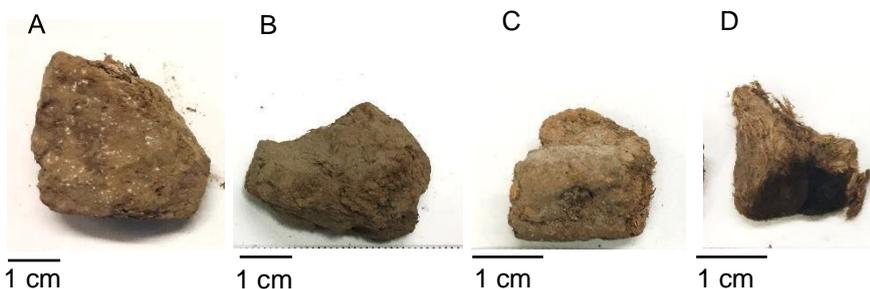


Figura 11: Morfologia dos coprólitos analisados similares as fezes de mamíferos. A– Ordem Carnívora, B- Marsupial, C, D e E– Bovino, F- Primatas ancestrais e homem. Fonte: PaleoG

As amostras selecionadas e que não possuíram similaridade com as fezes descritas por Chame e colaboradores são: GG02, GG13, GG30, GG32, GG33, GG41, GG48, GG52 e GG58 (Figura 12)



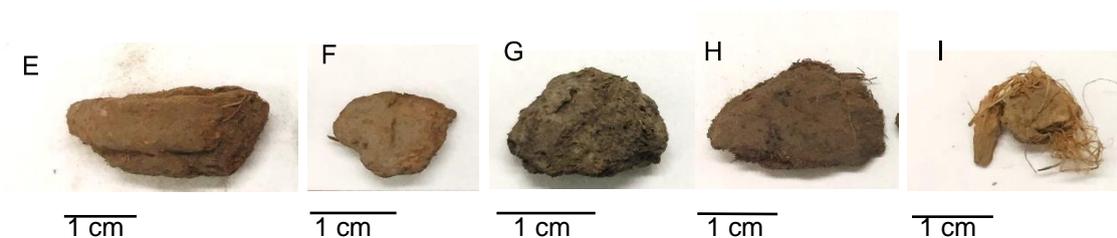


Figura 12: Morfologia dos coprólitos analisados diferentes das fezes de mamíferos. A- GG02, B- GG13, C- GG30 D- GG32, E- GG33, F- GG41, G- GG48, H- GG52, I- GG58. Fonte: PaleoG

Gráficos foram construídos com o objetivo de compreender melhor a dinâmica de disposição, distribuição, morfologia e morfometria dos coprólitos (Gráficos 1 a 5). De maneira geral os 80 coprólitos estão bem distribuídos entre todos os setores do sítio arqueológico (Gráfico 1).

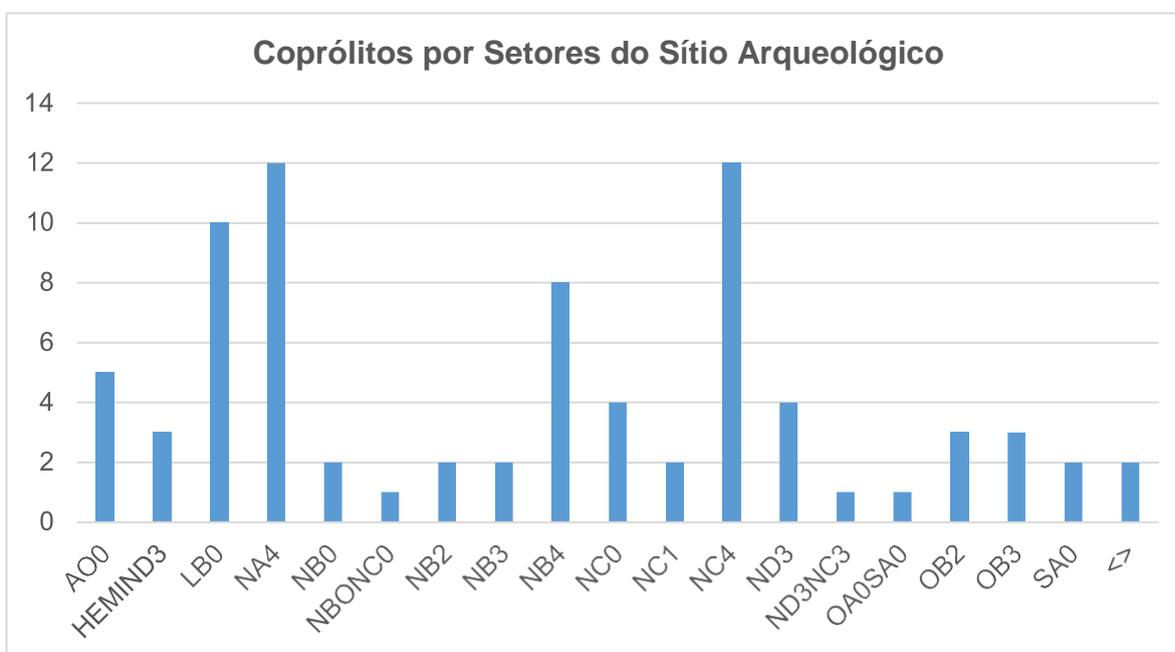


Gráfico 1: Número de coprólitos (N= 80) por setor do sítio arqueológico Gruta do Gentio II, Unaí, MG. Eixo x – Nomenclaturas dos setores escavados. Eixo y – Quantidade de coprólitos encontrados, <> - Coprólitos sem informação de setor.

Em relação a estratigrafia, indicativo de antiguidade por setorização, foi observada em uma extensão de 0 a 155cm de profundidade escavada no sítio, o destaque para os setores LB0 e NB4 com 7 camadas estratigráficas (Gráfico 2). Especificamente no setor NB4 são reportadas datações de 8.125 a 7.295 A.P. e 3.490 ± 410 A.P. para as camadas de 30 a 70cm e de 0 a 20cm, respectivamente. Quanto a coloração dos coprólitos, foram identificadas 10 cores, com a predominante 5/2, e o setor NA4 com 6 tonalidades diferentes (Gráfico 3).

Todos as classes de volumes descritos foram encontradas no sítio GGII, a classe “complexo” está distribuída em todas as camadas estratigráficas e a maior variedade foi de 3 classes de volume em duas camadas estratíficas, a de 10 a 20cm e de 20 a 30cm (Gráfico 4). Na análise combinada de número de coprólitos e suas classes de volumes por setor, se destaca o setor NC4, com um maior número de amostras e diversidade de volumes (Gráfico 5).

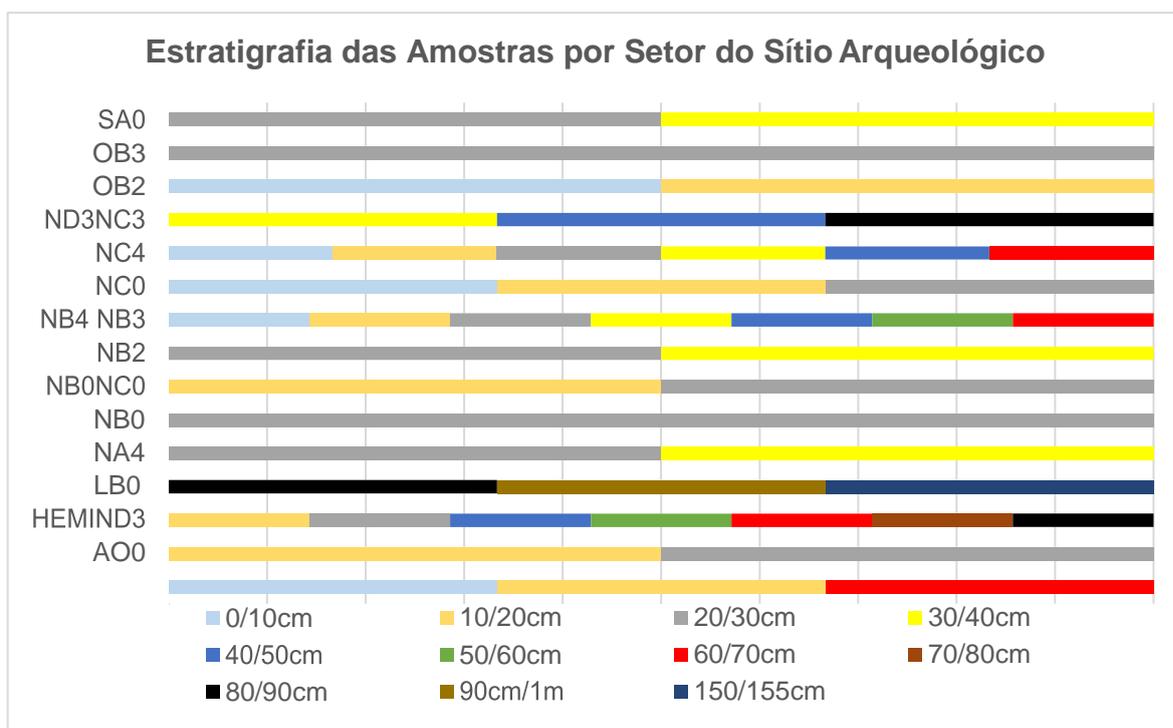


Gráfico 2: Estratigrafia das amostras escavadas em por setor do sítio arqueológico. Eixo x – Estratigrafia determinada profundidade por cores; Eixo y – Setor.

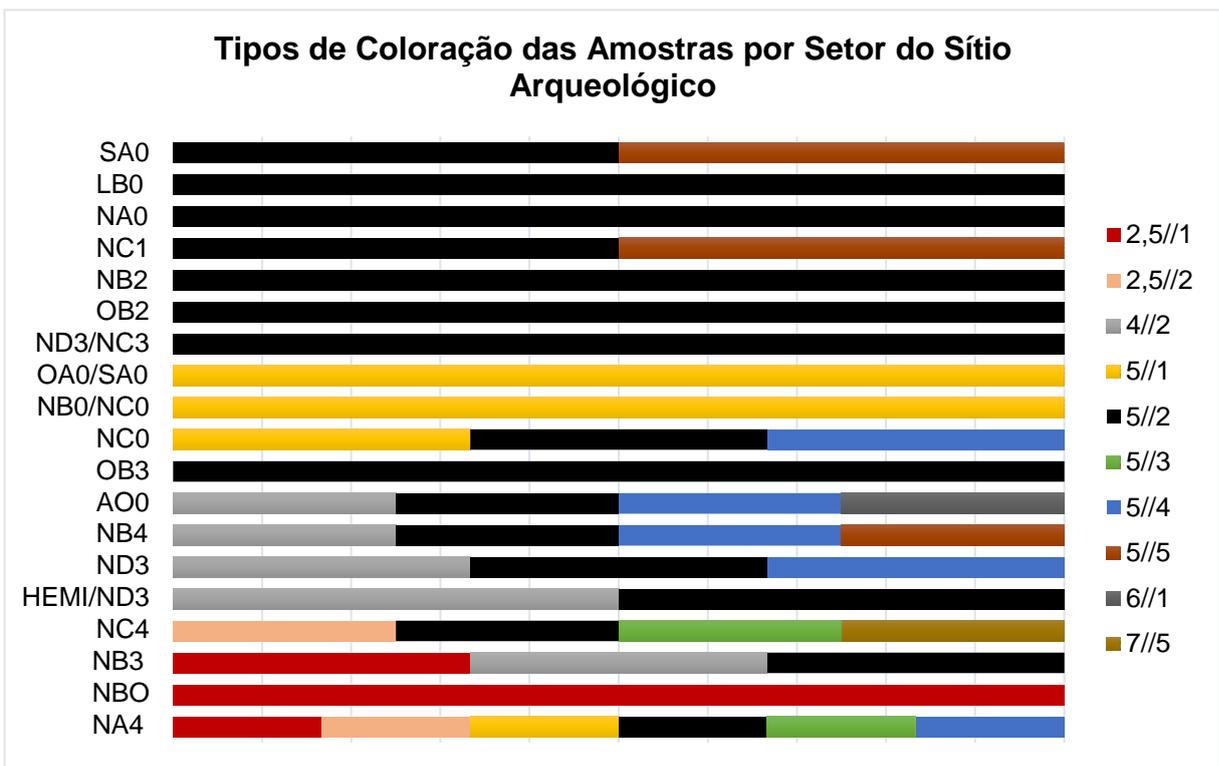


Gráfico 3: Diversidade de coloração das amostras por setor. Eixo x-Coloração segundo *Munsell Soil Chart*; Eixo y – Setor.

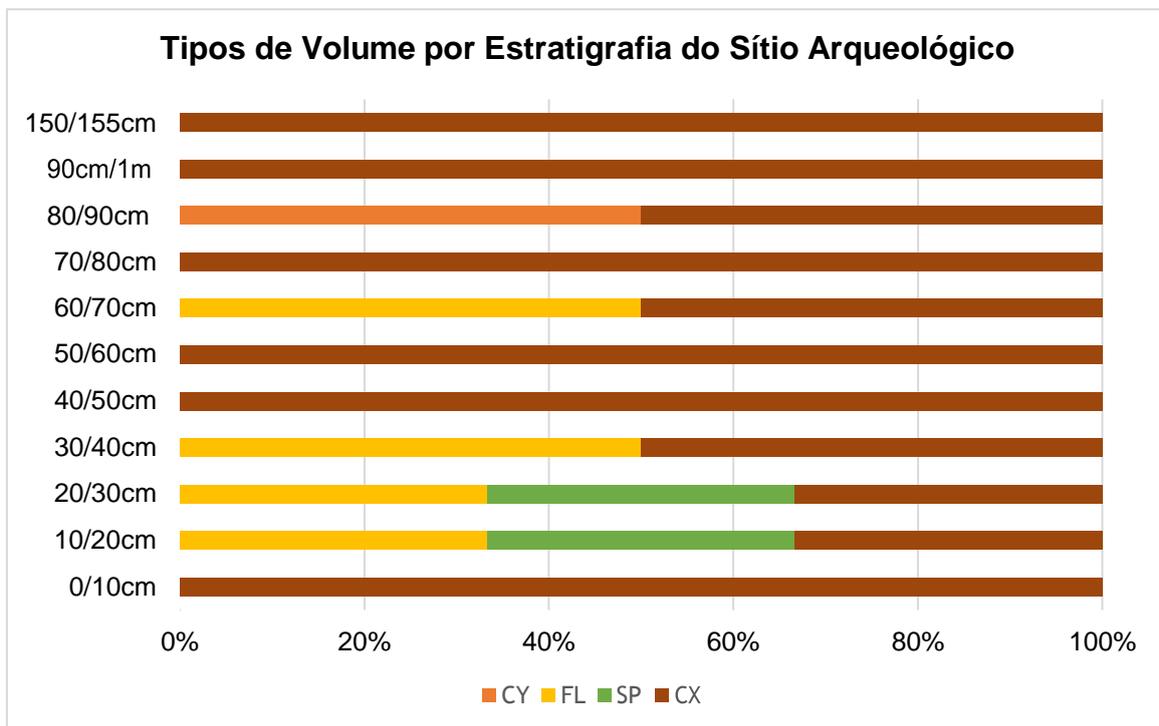


Gráfico 4: Tipos de volume das amostras de coprólitos segundo a estratigrafia onde foram escavados. CY: Cilíndrico; FL: Achatado; SP: Esférico; CX: Complexo.

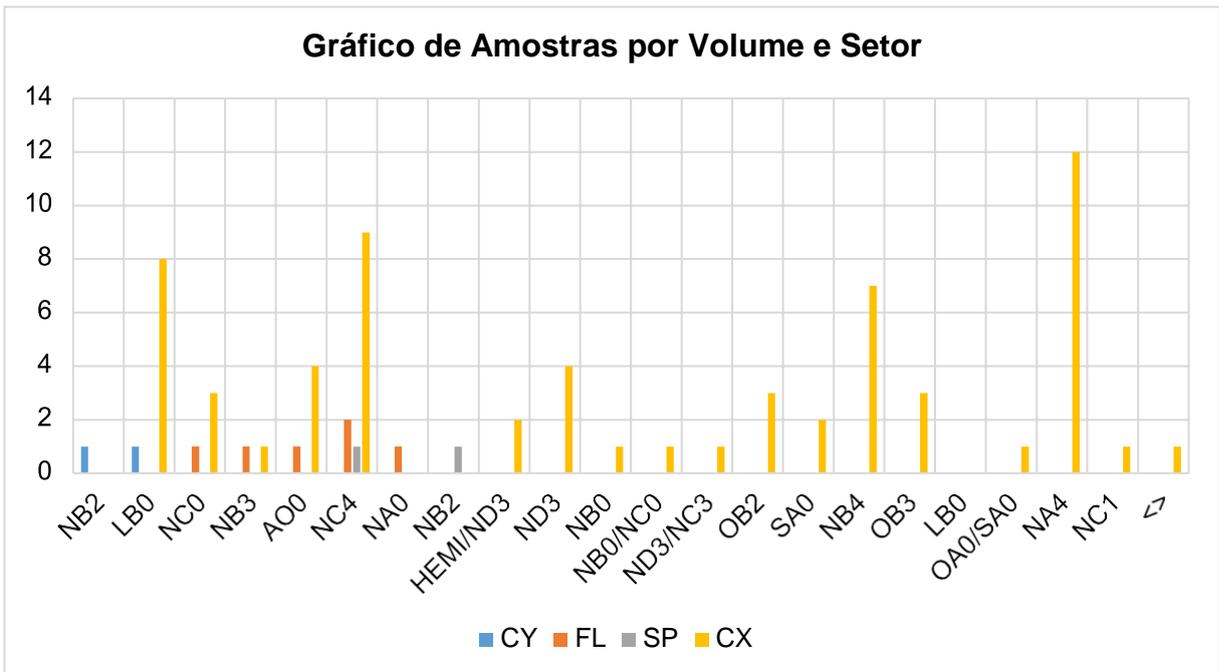


Gráfico 5: Número de amostras de coprólitos e tipo de volume em relação ao setor onde foram escavados. CY: Cilíndrico; FL: Achatado; SP: Esférico; CX: Complexo. Eixo x: Setorização e Volume; Eixo y: Número de amostras.

4.2 Análise Paleoparasitológica

4.2.1 Teste do tempo de reidratação

De cada uma das 7 amostras utilizadas no teste, foram separados 3 fragmentos para os coprólitos nos períodos de 24h, 48h e 72h de tempo de reidratação para posterior análise microscópica. Diversos microvestígios, como grãos de pólen, larvas nematoides de taxonomia indeterminada e ovos de parasitos foram identificados (Gráficos 6-7).

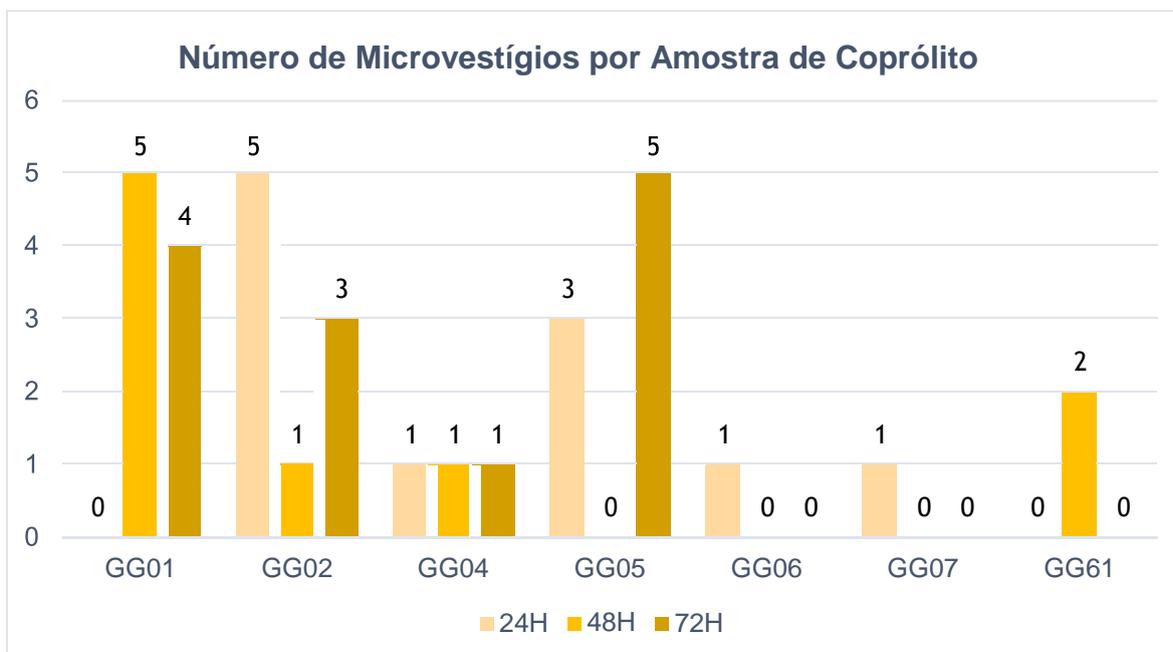


Gráfico 6: Número total de microvestígios encontrados por amostras de coprólitos incluídas no teste de tempo de reidratação.

Foram encontrados 12 grãos de pólen, 11 larvas de taxonomia indeterminada e 2 ovos de parasitos. Apesar dos microvestígios estarem distribuídos de maneira heterogênea dentre as amostras teste, foi observado que o tempo de 48 horas de reidratação possibilitou a recuperação não só de grãos de pólen e de larvas, mas como do ovo de parasito identificado. Desta forma, foi padronizado durante todo o estudo, o uso de 48h de reidratação no processamento das amostras restantes.

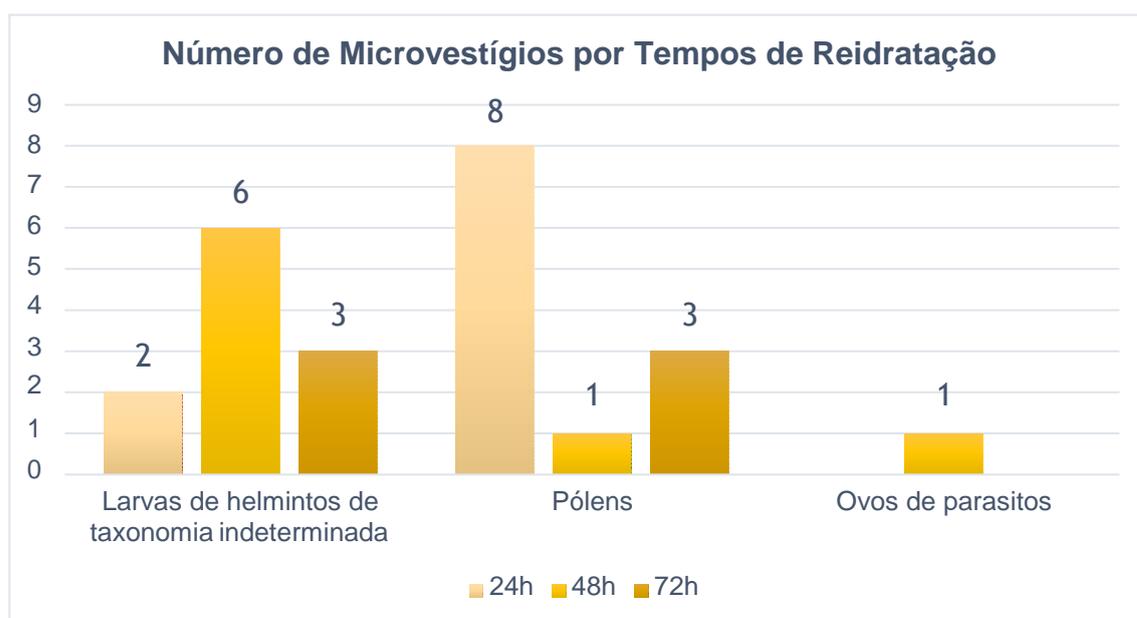


Gráfico 7: Número de microvestígios encontrados na análise de tempo de reidratação.

422 Identificação de parasitos

Na análise paleoparasitológica dos 80 coprólitos, foi possível identificar ovos de parasitos helmintos, assim também como larvas de taxonomia indeterminada. Das 17 amostras positivas na análise paleoparasitológica, um total de 78 ovos de parasitos foram encontrados em 9 coprólitos distintos. Em relação às larvas, foram 8 amostras positivas contendo 32 larvas de taxonomia indeterminada.

Em relação aos parasitos encontrados, usando como base a literatura taxonômica dos grupos, foram observados 2 ovos de tricostrongilídeos, 2 ovos de ancilostomídeos (62), 10 ovos de capilarídeos (64), 63 ovos de *Spirometra* sp. (65) e 2 ovos de *Echinostoma* sp. (66,67) (Gráfico 8).

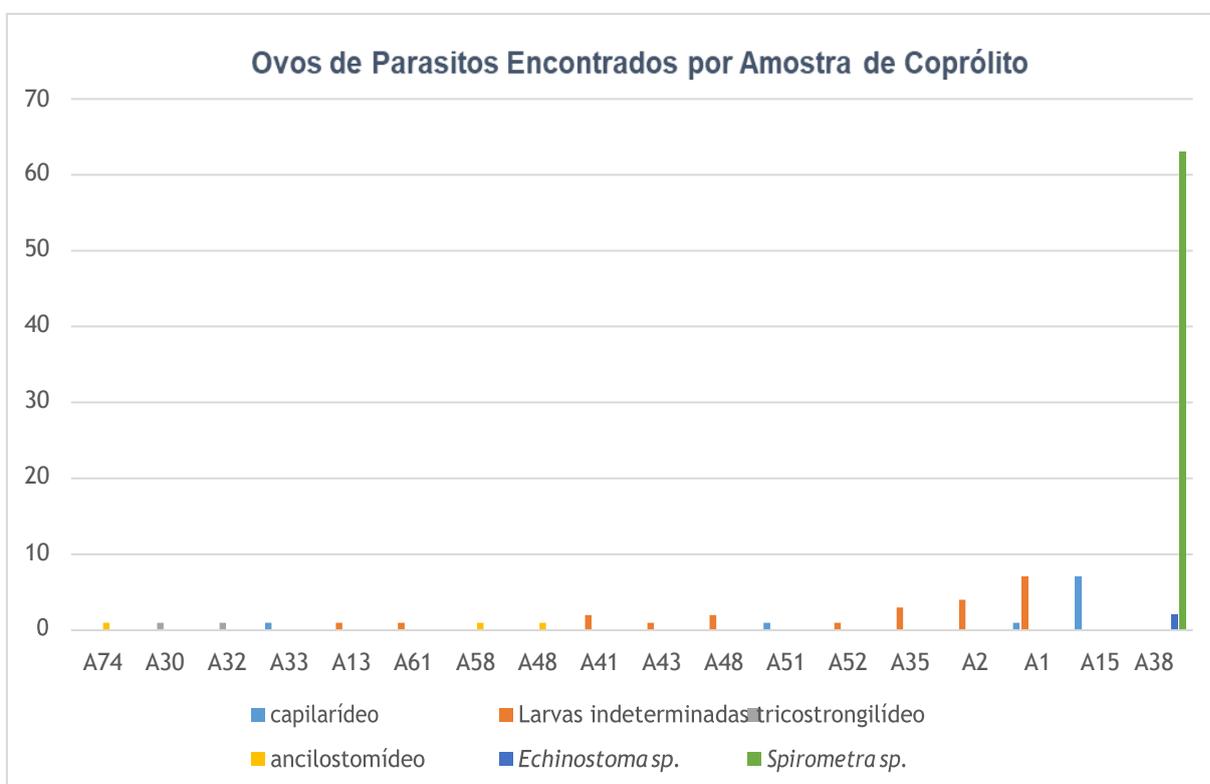


Gráfico 8: Ovos de parasitos encontrados por amostra de coprólitos do Sítio Arqueológico GGII. Eixo X: Ovos de parasitos identificados em suas respectivas amostras. Eixo Y: Número de ovos de parasitos.

Datação	Coprólito	Estrato	Setor	ID do Parasito	Medidas Comprimento	Largura	Comp.Opérculo	Larg.Opérculo
NP	GG01	10/20cm	ND3	Capillariidae	51,672µm	25,032µm	6,444µm	2,348µm
NP	GG15	NI	ND3	Capillariidae	76,923µm	30,312µm	9,739µm	7,192µm
NP	GG15	NI	ND3	Capillariidae	60,740µm	41,027µm	NP	NP

NP	GG15	NI	ND3	Capillariidae	63,556µm	43,221µm	NP	NP
NP	GG15	NI	ND3	Capillariidae	59,952µm	39,741µm	NP	NP
NP	GG15	NI	ND3	Capillariidae	41,204µm	52,644µm	NP	NP
NP	GG15	NI	ND3	Capillariidae	58,636µm	41,086µm	NP	NP
NP	GG74	50/60cm	LB0	Ancylostomatidae	67,453µm	34,913µm	NA	NA
8.125 a 7.295 A.P.	GG30	30/40cm	NB4	<i>Trichostrongylus</i> sp.	84.,46µm	47,200µm	NA	NA
8.125 a 7.295 A.P.	GG32	20/30cm	NB4	<i>Trichostrongylus</i> sp.	80,553µm	42,828µm	NA	NA
NP	GG33	0/10cm	NB4	Capillariidae	48,830µm	21,103µm	NA	NA
3.490 ± 410 A.P.	GG38	10/20cm	OA0	<i>Echinostoma</i> sp.	123,389µm	53,356µm	NA	NA
3.490 ± 410 A.P.	GG38	10/20cm	OA0	<i>Echinostoma</i> sp.	98,929µm	63,424µm	NA	NA
3.490 ± 410 A.P.	GG38	10/20cm	OA0	<i>Spirometra</i> sp.	60,27µm	43,284µm	NA	NA
3.490 ± 410 A.P.	GG38	10/20cm	OA0	<i>Spirometra</i> sp.	61,881µm	43,519µm	NA	NA
3.490 ± 410 A.P.	GG38	10/20cm	OA0	<i>Spirometra</i> sp.	64.,29µm	36.,64µm	NA	NA
3.490 ± 410 A.P.	GG38	10/20cm	OA0	<i>Spirometra</i> sp.	60,190µm	37,543µm	NA	NA
3.490 ± 410 A.P.	GG38	10/20cm	OA0	<i>Spirometra</i> sp.	64,991µm	34,021µm	NA	NA
NP	GG51	40/50cm	NC4	Capillariidae	49,779µm	26,073µm	6.808µm	6.714µm
NP	GG58	10/20cm	NC4	Ancylostomatidae	69,730µm	37,541µm	NA	NA

Tabela 1: Resultados da análise paleoparasitológica dos coprólitos da GGII analisados neste estudo. Contendo Informações de setorização, datação e morfometria dos ovos de helmintos encontrados. NI- Não informado. NP – Não possui. NA – Não se aplica.

Foram encontrados ovos de capilarídeos com pelo menos quatro morfotipos, segundo a literatura específica do grupo (64), em quatro amostras, GG01 (n=1), GG15 (n=6), GG33 (n=1) e GG51 (n=1). Foram identificados 4 morfotipos, por meio das ornamentações externas da casca dos ovos. O primeiro morfotipo de ovo de capilarídeo encontrado na amostra GG01, apresentou ornamentação do tipo estriada (Figura 13).



Figura 13: Ovo de capilarídeo da amostra GG01. A: Plano morfométrico B: Detalhes da ornamentação estriada externa. Primeiro morfotipo.

O segundo e o terceiro morfotipo de ovos de capilarídeos foram encontrados na amostra GG15 (Figuras 14-15). Ambos apresentaram morfologia externa lisa, ou seja, a ausência de ornamentação na casca. Na análise do segundo morfotipo, o diagnóstico de *Trichuris vulpis* foi considerado devido aos dados de morfometria e ausência de ornamentação, comparados aos outros morfotipos de capilarídeos identificados no estudo. O diagnóstico diferencial descartou a espécie *T. vulpis* por apresentar morfometria distinta do ovo identificado neste trabalho (76µm - 30µm) (Tabela 1), segundo a literatura de Hall (média de 82µm - 38µm) (68).

No terceiro morfotipo (Figura 15), análises de média e desvio padrão foram acrescentados ao estudo, corroborando com o resultado parasitológico e morfométrico. Os cinco espécimes de ovo da família Capillariidae foram levados em consideração decorrente ao valor de morfologia similares. A média dos comprimentos dos cinco ovos encontrados do segundo morfotipo foi de $\bar{X} = 59,874$, com o desvio padrão foi de $\sigma = 2,338$. Enquanto que a média das larguras do mesmo morfotipo foi de $\bar{X} = 41,256$ com o desvio padrão de $\sigma = 1,117$.



Figura 14: Ovo de capilarídeo da amostra GG15. A-B: Detalhes da ornamentação externado tipo lisa. Segundo morfotipo.



Figura 15. Ovo de capilarídeo na amostra GG15. A-B: larva no interior do ovo visível. B: Detalhes da ornamentação lisa externa (100X). Terceiro morfotipo.

O quarto morfotipo (Figura 16) foi encontrado na amostra GG33, apresentou ornamentação externa de casca do tipo estriada, mas com formato diferente do encontrado no primeiro morfotipo, assim também como com diferente morfometria.

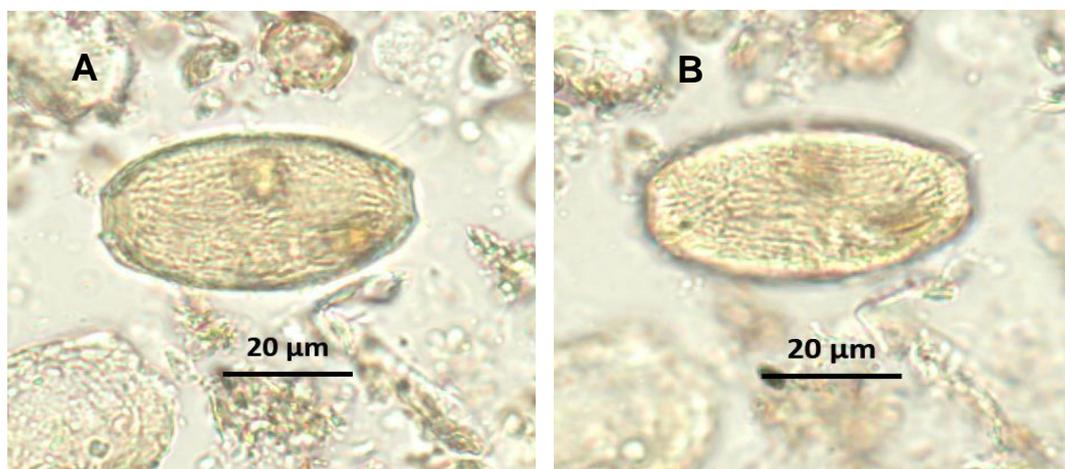


Figura 16: A: Ovo de capilarídeo da amostra GG33. B: Detalhes da ornamentação estriada externa. Quarto morfotipo.

O último morfotipo (Figura 17) foi encontrado na amostra 51. Também possui externamente ornamentação estriada, diferentes das apresentadas no primeiro e no quarto morfotipo, assim como as medidas de comprimento e largura (Tabela 1).

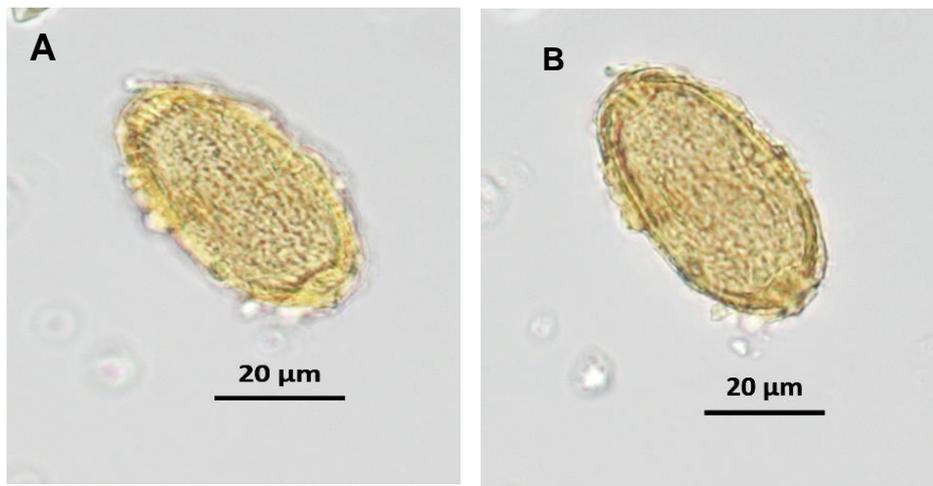


Figura 17: A: Ovo de capilarídeo da amostra GG51. B: Detalhes da ornamentação estriada externa.

Os ovos de ancilostomídeos (Figura 18) foram identificados com características de formato elipsóide, casca hialina e delgada, a presença de embrião morulado no interior e morfometria entre 50µm - 70µm de comprimento e 36µm - 42µm de largura, segundo a literatura do grupo (62).

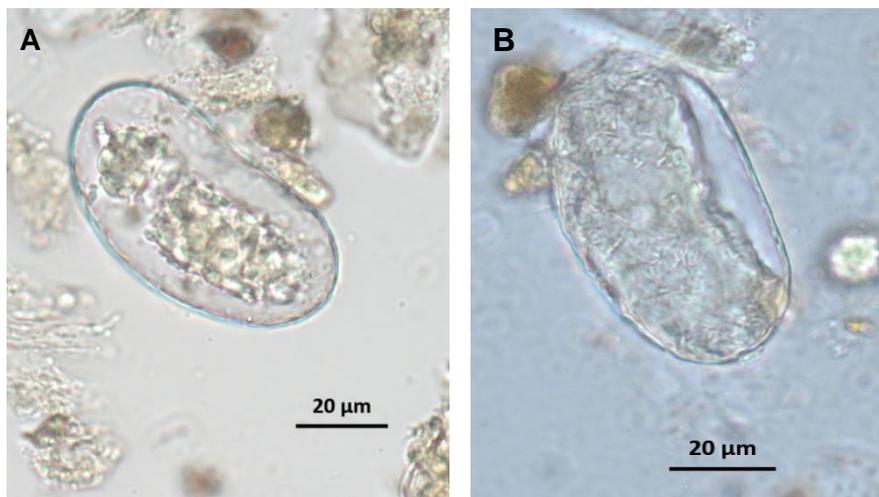


Figura 18: Ovos de ancilostomídeo encontrados neste estudo. A: Amostra GG74. B: Amostra GG58.

Os ovos de tricostrongilídeos (Figura 19) foram identificados com características morfológicas similares aos ovos de ancilostomídeos, de formato elipsóide e casca delgada, porém, com maior tamanho, entre 81µm - 104µm de comprimento e 40µm - 48µm de largura, segundo a literatura do grupo (62).

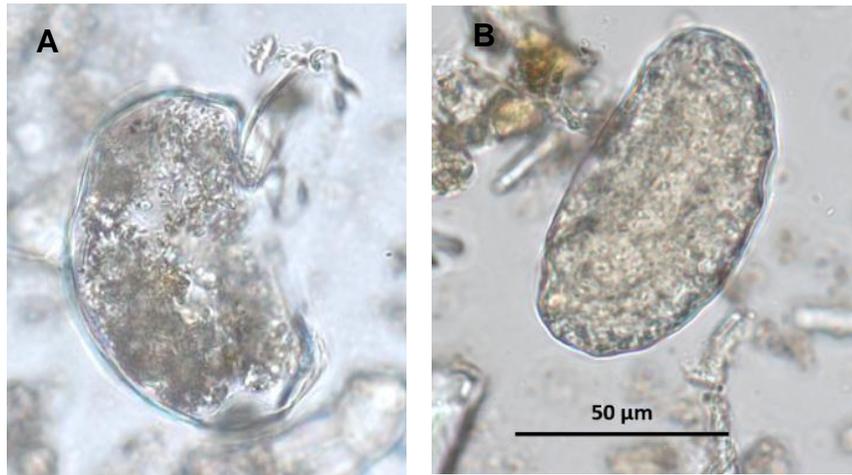


Figura 19: Ovos e trichostrongilídeo encontrados neste estudo. A: Amostra GG30 (40X). B: Amostra GG32.

Ovos de *Spirometra* sp. (Figura 20A e B) foram identificados com base nas extremidades pontiagudas e cônicas próximas aos opérculos, assim como a morfometria descrita segundo a literatura do grupo (65μm - 37μm) (65). Dois morfotipos de ovos de *Echinostoma* sp., foram identificados (Figura 20C e D) pela forma elíptica, coloração amarela-marrom e medidas como descritos na literatura (64), entre 90μm - 130μm para comprimento e 50μm – 70μm para largura.

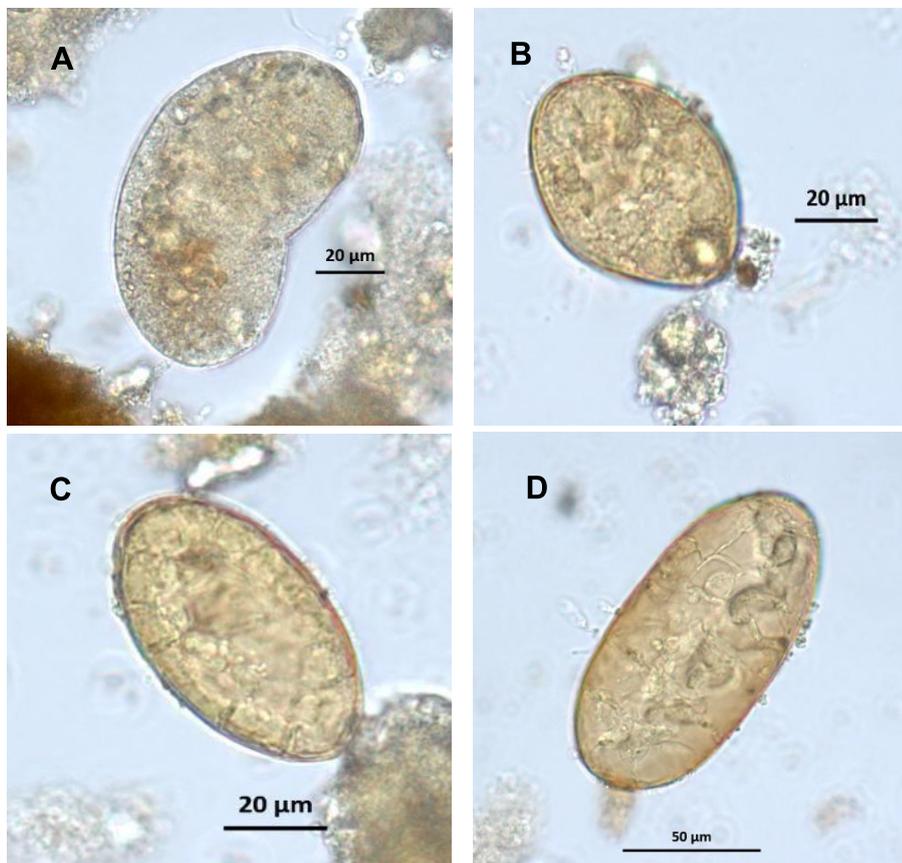


Figura 20: A; B - Ovos de *Spirometra* sp. C; D - Ovos de *Echinostoma* sp. Todos na amostra GG38

Larvas de helmintos de taxonomia indeterminada foram observadas em 10 amostras, GG01, GG02, GG13, GG31, GG35, GG41, GG43, GG48, GG52 e GG61.

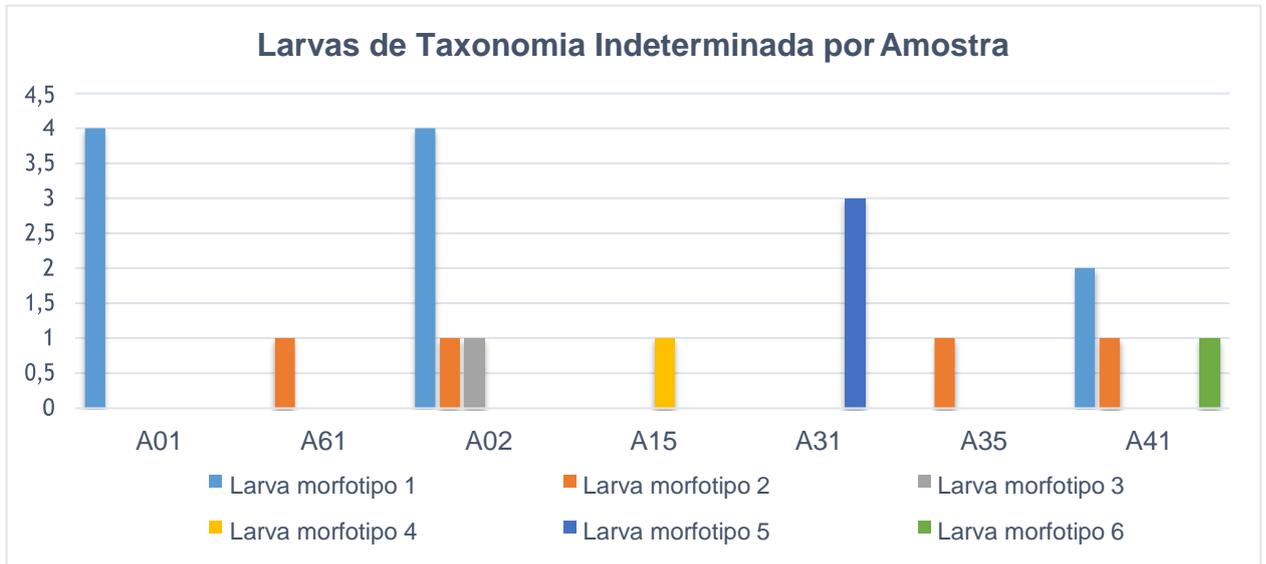


Gráfico 8: Larvas de taxonomia por amostra identificadas neste estudo.

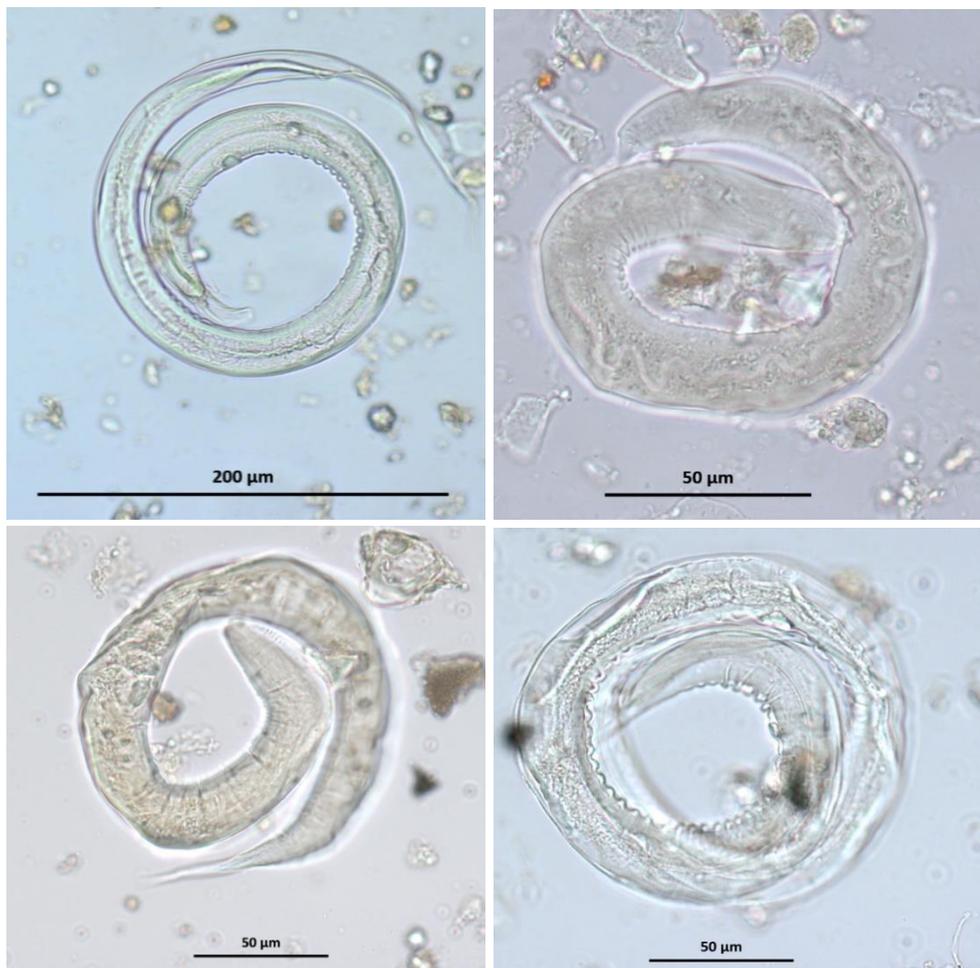


Figura 21: Morfotipos de larvas de taxonomia indeterminada.

Juntamente com os achados paleoparasitológicos, foram encontrados vestígios de vegetais, grãos de pólen, invertebrados e fitólitos na análise microscópica dos coprólitos.

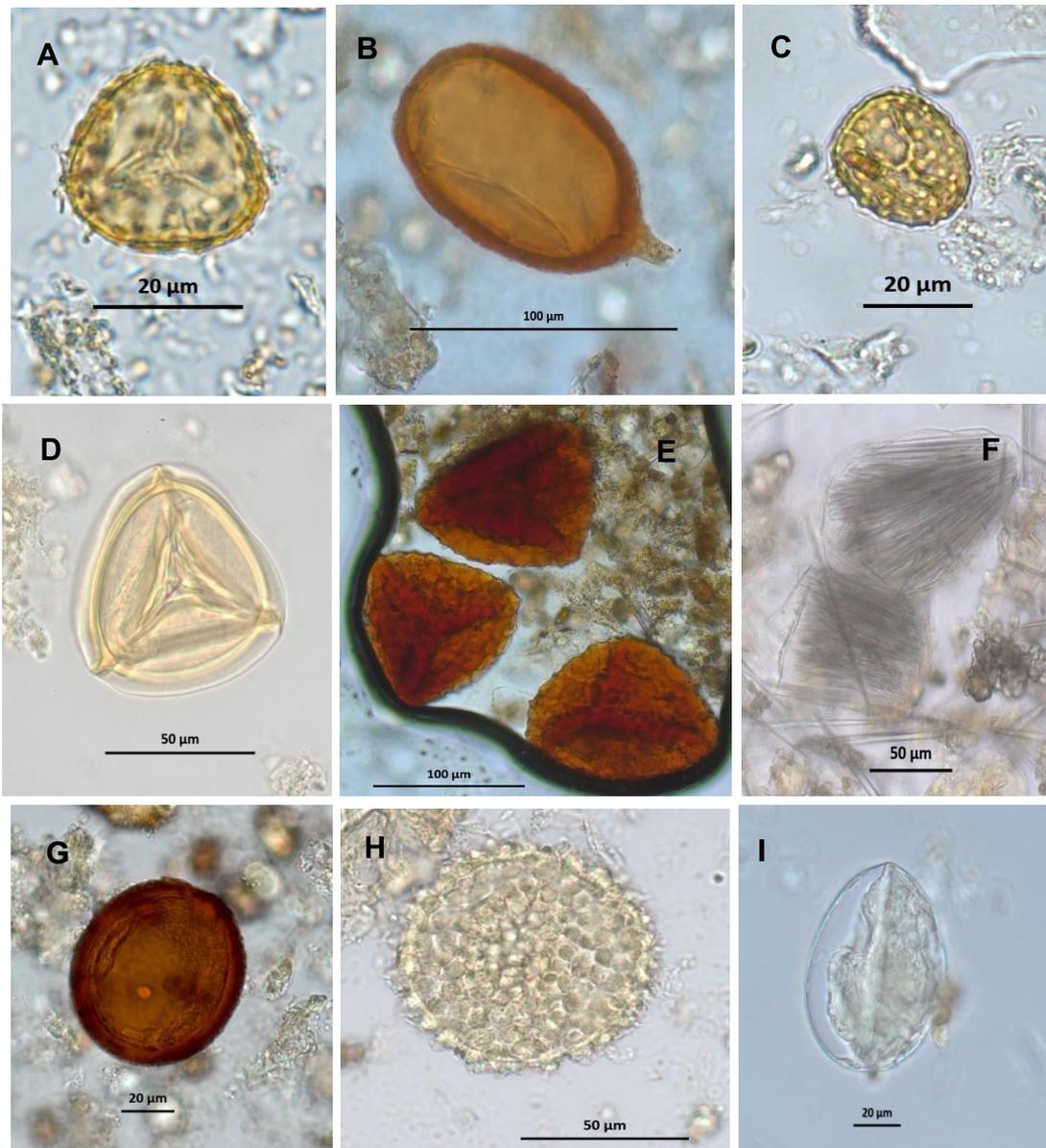


Figura 22: Sedimentos identificados durante a análise microscópica dos coprólitos. A, C, D, E, G, H e I: Grãos de pólen. B: Vestígio vegetal. F: Acúmulo de fitólitos de planta do tipo ráfide.

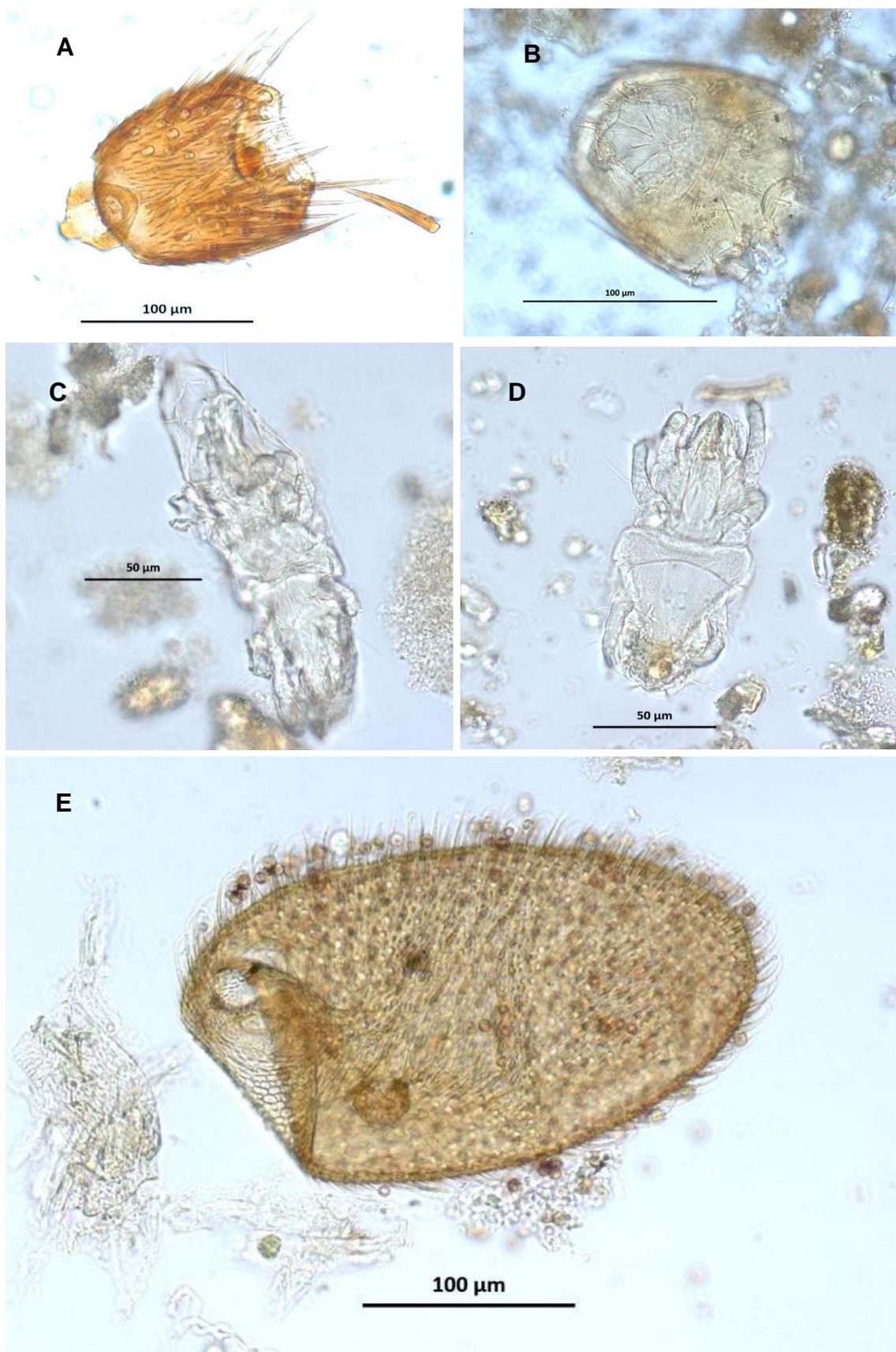


Figura 23: Vestígio de invertebrados identificados durante a análise microscópica dos coprólitos. A, B e E: Vestígios de insetos. C e D: Ácaros.

4.3 Análise Paleogenética

As extrações de aDNA dos coprólitos demonstraram concentrações que variavam de 10 ng/μl a 20 ng/μl. A análise paleogenética para a determinação da origem animal dos coprólitos foi conduzida em 19 amostras que apresentaram positividade para ovos de parasitos e larvas (Tabela 2). Das amostras positivas na paleoparasitologia submetidas a *Barcoding DNA*, somente em uma não foi possível identificar a origem do hospedeiro, pois mostrou um perfil de sequência múltipla superposta, desta forma, esta amostra será submetida à análises posteriores.

Resultados

Amostra	Paleoparasitologia	Paleogenética	Máxima Identidade Genética	Cobertura de Sequência	Referência <i>GenBank</i>
GG01	Capillariidae	<i>Panthera Onca</i> (Onça Pintada)	98,48%	100%	KX419751
GG15	Capillariidae	<i>Didelphis albiventris</i> (Gambá de Orelha Branca)	99,06%	100%	FI28227
GG74	Ancylostomatidae	<i>Homo sapiens</i>	99,53%	100%	MG571158
GG30	<i>Trichostrongylus</i> sp.	<i>Homo sapiens</i>	100%	100%	MG571158
GG32	<i>Trichostrongylus</i> sp.	<i>Homo sapiens</i>	99,33%	100%	MG571158
GG33	Capillariidae	<i>Bos taurus</i> (Gado doméstico)	100%	99%	AB098857
GG38	<i>Spirometra</i> sp./ <i>Echisnostoma</i> sp	<i>Leopardus pardalis</i> (Jaguaririca)	99,54%	100%	KP202284
GG51	Capillariidae	<i>Bos taurus</i> (Gado doméstico)	98,13%	100%	AB098857
GG58	Ancylostomatidae	<i>Homo sapiens</i>	99,32%	100%	MG571158
GG02	Larva TI	<i>Homo sapiens</i>	99,48%	100%	MG571158
GG13	Larva TI	<i>Homo sapiens</i>	100%	100%	MG571158
GG35	Larva TI	<i>Bos taurus</i> (Gado doméstico)	98,63%	100%	MK028750
GG41	Larva TI	<i>Philander opossum</i> (Cuíca)	98,51%	100%	KJ868146
GG43	Larva TI	<i>Bos taurus</i> (Gado doméstico)	100%	100%	MK028750
GG48	Larva TI	<i>Homo sapiens</i>	99,33%	97%	MG571158
GG52	Larva TI	<i>Homo sapiens</i>	100%	100%	MG571158

Tabela 2: Resultados paleoparasitológicos e paleogenéticos positivos das amostras positivas. Larva TI – Larva de Taxonomia indeterminada

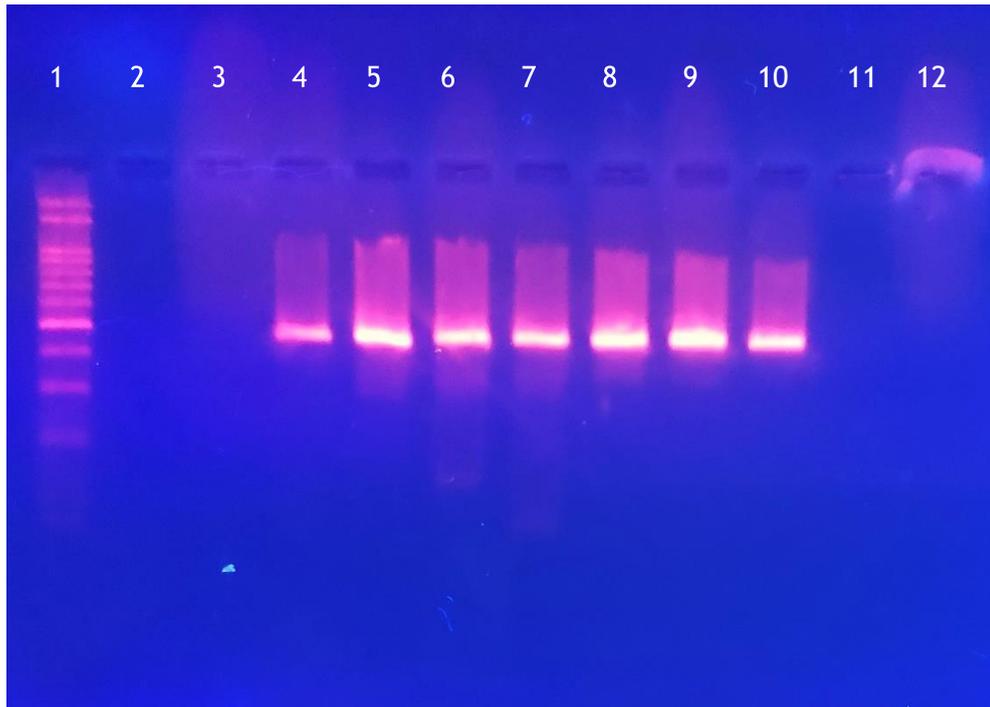


Figura 24: Eletroforese em gel de agarose *low melting* a 3%, ampliações do alvo 12S rDNA para identificação da origem do coprólito em amostras positivas na análise paleoparasitológica. Pista 1: Marcador de peso molecular DNA 50pb (*Ludwig*). Pistas 3-10: amostra GG 13; GG31; GG 35; GG41; GG51; GG43; GG48, GG52, GG02. Pista 12: Controle negativo da PCR. Alvo Molecular: 215pb.

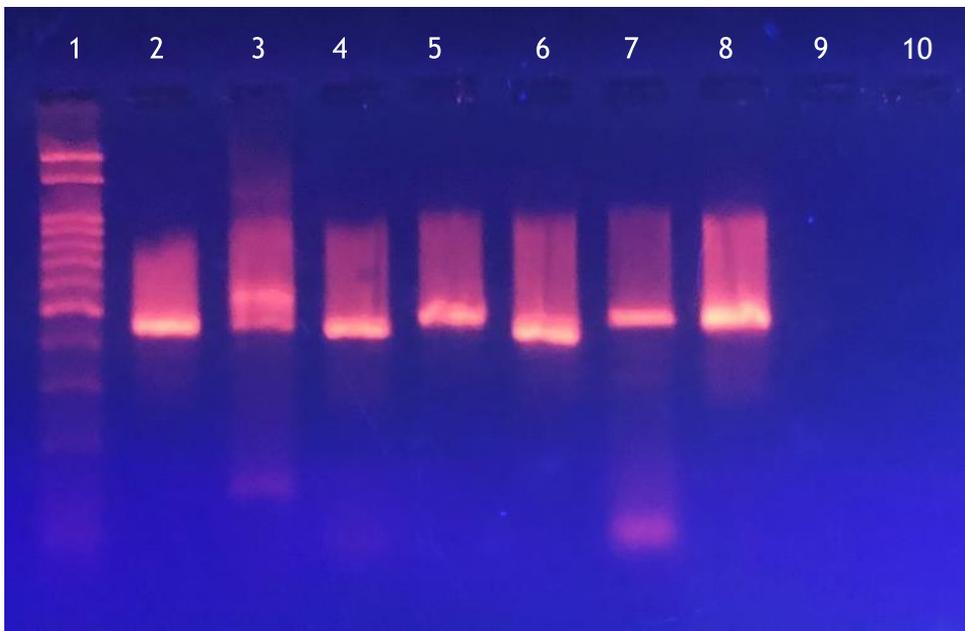


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose *low melting* a 3%, ampliações do alvo 12S rDNA para identificação da origem do coprólito em amostras positivas na análise paleoparasitológica. Pista 1: Marcador de peso molecular DNA 50pb (*Ludwig*). Pistas 2-8: amostras GG 32; GG33; GG 38; GG30; GG51; GG58; GG74. Pista 10: Controle negativo da PCR. Alvo Molecular: 215pb.

4.4 Análise integrada dos coprólitos do sítio Gruta do Gentio II

Com a intenção de entender mais sobre a distribuição paleoecológica das amostras positivas nas análises paleoparasitológicas e paleogenéticas, uma tabela foi formada com dados de setorização, camada estratigráfica e datação quando presente.

Em relação a análise integrativa dos resultados por datação arqueológica, três coprólitos foram associados ao horizonte caçador-coletor, que arqueologicamente possui uma maior quantidade de registros líticos usados para caça e sobrevivência, além de elementos malacológicos e ossos de animais (48). Dois foram encontrados no setor NB4 (Figura 28 e 29), em um mesmo estrato que possui datação condizente com a pedra fogueira, 8.215 A. P. O registro de coprólitos em estrato com a mesma datação da única fogueira datada em GGII possuem origem humana, assim como a presença de ovos de *Trichostrongylus* sp. O terceiro coprólito localizado no setor ND3 (Figura 27), próximo a região da fogueira foi identificado como de origem humana e possuía a presença de larvas de taxonomia indeterminada.

Três coprólitos estavam associados ao horizonte horticultor. O primeiro no setor OA0 (Figura 26), e o segundo no setor NB0 (Figura 28), os quais estavam localizados próximos à entrada principal. O terceiro, no setor OB3, (Figura 28) se localiza na região oeste da gruta. O primeiro coprólito, identificado como de jaguatirica, revelou a presença de *Spirometra* sp. Já o segundo e o terceiro possuíam a presença de larvas de taxonomia indeterminada e a origem de cuíca e humano, respectivamente.

As demais amostras contendo parasitos não têm datação, e como cada setor possui um tempo geológico distinto para cada estrato arqueológico, só é possível aferir a respeito da profundidade onde estas se encontravam. Destas, uma amostra identificada em uma profundidade de 5 a 10 cm (Figura 32), localizada no setor NB4 com determinação de origem de gado doméstico, demonstrou um ovo de capilarídeo. Duas amostras estavam depositadas na profundidade de 10 a 20 cm, uma com origem de onça pintada e presença de um ovo de capilarídeo, e a segunda, com um ovo de ancilostomídeo, e origem do coprólito humano, nos setores ND3 e NC4, respectivamente (Figura 26). Uma amostra no setor NC4, no nível de 40 a 50 cm possuiu a origem de gado doméstico contendo ovo de capilarídeo (Figura 27). Na profundidade de 50 a 60 cm no setor LBO, foi identificado uma amostra contendo ovo de ancilostomídeo com origem humana (Figura 31). A presença de coprólito de *D. albiventris* foi constatada em material do salvamento de uma camada não identificada,

e desta forma, é necessária uma maior investigação com o objetivo de atribuir o achado ao tempo cronológico determinado.

5. DISCUSSÃO

5.1 Sistema de classificação dos coprólitos do sítio Gruta do Gentio II

Foi possível observar e recuperar dos coprólitos da GGII informações de modificações tafonômicas como alterações físicas do material em relação ao tempo de preservação, inclusões como dentes ou penas de animais, restos de vegetais, grãos de pólen, fitólitos e fragmentos de insetos (Figuras 22 e 23). Segundo Lorente e colaboradores (70) os compostos do solo no Cerrado, abundantes em nutrientes vegetais como milheto, clima seco e semi-úmido nas datações de 11.000 a 5.000 A.P., e a baixa taxa de umidade, se assemelha ao clima do Cerrado atualmente, o que auxiliou na preservação do material orgânico (70–72).

Os coprólitos podem ser considerados reservatórios qualitativos ou quantitativos de informações paleoecológicas (73). O material passa por processos tafonômicos e a “prefossilização” deve ocorrer prontamente ao contato com o solo. Para a formação dos coprólitos, a amostra precisa estar em uma condição onde exista estagnação dos mecanismos de degradação e da perda de materiais orgânicos. Desta forma, os coprólitos preservados podem ser considerados, *conservant lagerstätten* (Depósitos conservantes), depósitos paleoecológicos que ajudam na conservação de restos animais, ossos e restos de alimentação (71,74) e parasitos, como observado no presente estudo.

Grutas podem ser utilizadas como local de sepultamentos ritualísticos. O ritual funerário se entende como o conjunto de manifestações coletivas pela ocasião da morte de um membro do grupo, esta forma de expressão cultural pode ser manifestada em locais construídos somente para o fim funerário (52).

Os humanos modernos divergiram de seu ancestral “arcaico” a mais de 200 milhares de anos atrás na África, idade relativamente recente comparada a outros homínídeos como o Neanderthal e Denisovan, que utilizavam pedras para a confecção de ferramentas há 500 mil anos A.P. Pinturas rupestres em rochas já foram identificadas com datações anteriores a 32 mil anos A.P., evidenciando que em épocas remotas, cavernas e grutas já eram utilizadas pelos homínídeos, seja para habitação ou rituais funerários (75,76).

O sítio GGII foi caracterizado como um local ritualístico. O ritual da morte em algumas culturas se apresenta de forma complexa, onde todos os integrantes de uma aldeia se mobilizavam para o evento (48). Segundo Sene (48), as celebrações e homenagens podiam perdurar por muitos dias, levando o espaço cerimonial a ser utilizado para alimentação. Apesar do encontro de cerâmicas, cestarias e alimentos, nenhum resquício de cozinha, latrina ou qualquer outra evidência relacionada à vida cotidiana foi encontrado durante as escavações.

É neste contexto que GGII se encaixa, seus ocupantes a visitavam sazonalmente para o enterramento de indivíduos do grupo e ficavam no estabelecimento apenas o tempo para o ritual se concretizar. Desta forma, enquanto o grupo se mantinha ausente, animais de várias classes podiam utilizar do espaço para sobrevivência, como toca, abrigo temporário e até mesmo em busca por alimentos. A presença de coprólitos de animais carnívoros e onívoros pode nos oferecer várias perspectivas em relação às espécies que frequentaram o espaço, e à temporalidade em relação aos enterramentos humanos.

A diversidade observada após a aplicação do sistema de classificação dos coprólitos se confirma pelos resultados da análise paleogenética que mostrou a presença de *Didelphis albiventris*, *Philander opossum*, *Panthera onca*, *Leopardus pardalis*, *Bos taurus* e *Homo sapiens*. Neste trabalho, se demonstra que GGII foi utilizada não só por humanos, como também por animais. Os resultados que demonstraram a presença de animais neste estudo, sugerem que há muito tempo já existe esta interação na GGII.

Segundo Costa e colaboradores (77), o bioma Cerrado apresenta inúmeras classes de formações vegetais, como o campo limpo e sujo, cerradão, veredas, florestas-galerias e capões de mata, que apresentam uma infinita diversidade de flora e fauna. A fauna do Cerrado brasileiro é caracterizada por uma grande riqueza de espécies, algumas com caráter endêmico. Animais como a raposa do campo, veado campeiro, porco do mato, tatu canastra e ouriço cacheiro, estão incluídos em uma lista de aproximadamente 1501 espécies de aves, mamíferos e répteis, endêmicas da região (77). O que nos dá uma perspectiva da grande diversidade de espécimes circulantes. Estes animais, já habitavam o Cerrado há mais de 10 mil anos atrás, inclusive utilizando cavernas para abrigo, caça, hibernação, moradia fixa ou sazonal (78).

Em toda a região Brasileira existem registros fósseis de mamíferos em diversos tempos geológicos (79) e o Cerrado na região de MG se mostrou rico em resquícios

zoológicos. Ossos de diversos mamíferos do Pleistoceno, de pequeno, médio, grande porte, e inclusive da megafauna, foram identificados em sítios arqueológicos localizados em cavernas ao redor da região da Lagoa Santa, MG. Ossos de animais como canídeos, felinos, e roedores, foram recuperados e analisados para identificação taxonômica da fauna local (80–82).

Os coprólitos analisados no presente estudo apresentaram uma grande diversidade morfológica e morfométrica segundo os parâmetros de identificação segundo Jouy-Avantin e colaboradores (57). Esta é a proposta de classificação de coprólitos mais atualizada, e apesar de bem detalhada, precisa ser adequada a realidade de cada região e material a ser utilizado. Neste estudo, muitos coprólitos de formatos diversos foram catalogados como de forma “indeterminada”, nomenclatura modificada para “complexa” por se ajustar mais à presente análise.

Chame (58,83) desenvolveu um trabalho de análise morfológica de fezes de animais da região nordeste, com o principal objetivo de correlacionar aos achados paleoparasitológicos da época, e obter mais informações sobre a origem do material analisado. Posteriormente, o artigo de morfologia de fezes de alguns animais brasileiros foi utilizado como parâmetro de comparação com amostras de diversos trabalhos acadêmicos (84–87), inclusive no presente estudo.

A presença de algumas morfologias distintas às caracterizadas por Chame (58) pode ser devido às ações tafonômicas do solo no material, que podem ter mudado a forma externa com o passar dos anos e acúmulo de camadas estratigráficas. Assim como possíveis perturbações ocasionadas por desmoronamentos de certas áreas onde enterramentos foram encontrados, separados ou misturados.

O sítio GGII possui dois horizontes de subsistência definidos, o de caçador-coletor, mais antigo, e o horticultor, mais recente. Estes dois horizontes condizem a estratos e a datações distintas. O sítio foi separado dentro de cada horizonte em camadas estratigráficas por meio de coloração e datação, e pela sua complexidade, nem todos os estratos possuíam a mesma profundidade estimada por datação em cada setor. Em um determinado setor NB0, o estrato de 20 a 30 centímetros possui a datação de 3.490 ± 410 A.P., mas no setor ao lado NB1, o estrato de 20 a 30 centímetros pôde apresentar uma datação distinta, pois foram levados em consideração declives, depressões e relevos. GGII possui um piso quase que inteiramente desigual (49).

Desta forma, não foi possível recuperar as datações de todos os setores arqueológicos, e muitos dos que já tinham informações, não condiziam com setores

que continham coprólitos. Algumas amostras que possuíam ovos de parasitos intestinais, foram encontradas próximas ou associadas a única fogueira datada em 8.125 A.P. Sene & Seda (53) relatam a presença de resquícios líticos, fogueiras e inclusive enterramentos desde o horizonte caçador-coletor, demonstrando que GGII já era utilizada e frequentada por humanos desde 12 mil anos A.P.

GGII foi utilizada como local de cerimônia por muito anos, onde os humanos que a frequentavam, começaram a expressar elementos da cultura Una. No horizonte caçador-coletor, os enterramentos eram simples, sem objetos ou alimentos associados, a não ser por instrumentos líticos e fogueiras. O horizonte horticultor, apresenta um maior número de vestígios humanos, com cestarias, colares de dentes de animais e de sementes. Além de alimentos, este apresentou um maior número de artefatos encontrados durante as escavações, assim como diversos enterramentos humanos. É estimado que aproximadamente 100 gerações tenham frequentado o sítio arqueológico entre 7.450 e 10.300 A.P. (48).

A grande variedade de coprólitos por setor distribuídas em vários estratos, e em tempos cronológicos distintos, é reflexo da diversidade de mamíferos que constituem a fauna onde GGII está inserida. Como mencionado, animais de pequeno, grande e mega porte já habitavam o Cerrado Brasileiro antes do início do Holoceno (88).

Os estratos arqueológicos possuem datações diferentes e remetem a uma cronologia distinta nos horizontes culturais. Das nove amostras positivas para parasitos, quatro apresentaram informações referente as datações dos estratos. Duas estavam relacionadas ao horizonte horticultor em camadas datadas em 3.500 A.P., e duas referentes ao horizonte caçador-coletor, em camadas datadas em 8.125 a 7.295 A.P.

Na análise integrativa dos resultados do Sítio GGII, no setor ND3, localizado ao leste da fogueira, foram coletados coprólitos em 6 camadas estratigráficas, de 10 a 155 cm, com resultados paleoparasitológicos positivos em 3 amostras. Um primeiro coprólito positivo para ovos de capilarídeos, e de origem determinada como *D. albiventris* foi recuperado durante o salvamento do setor, segundo os registros do IAB. Parasitos da família Capillariidae foram reportados neste marsupial, gambá mais comumente encontrado no Cerrado Brasileiro, nos estados do Rio Grande do Sul e Minas Geras (89–91). O segundo coprólito identificado como de *P. onca*, positivo para um ovo de capilarídeo, estava no extrato de 10 a 20 cm (Figura 26). Este é o primeiro

registro de ovo de parasito da família Capillariidae parasitando felino da espécie *P. onca* no Brasil.

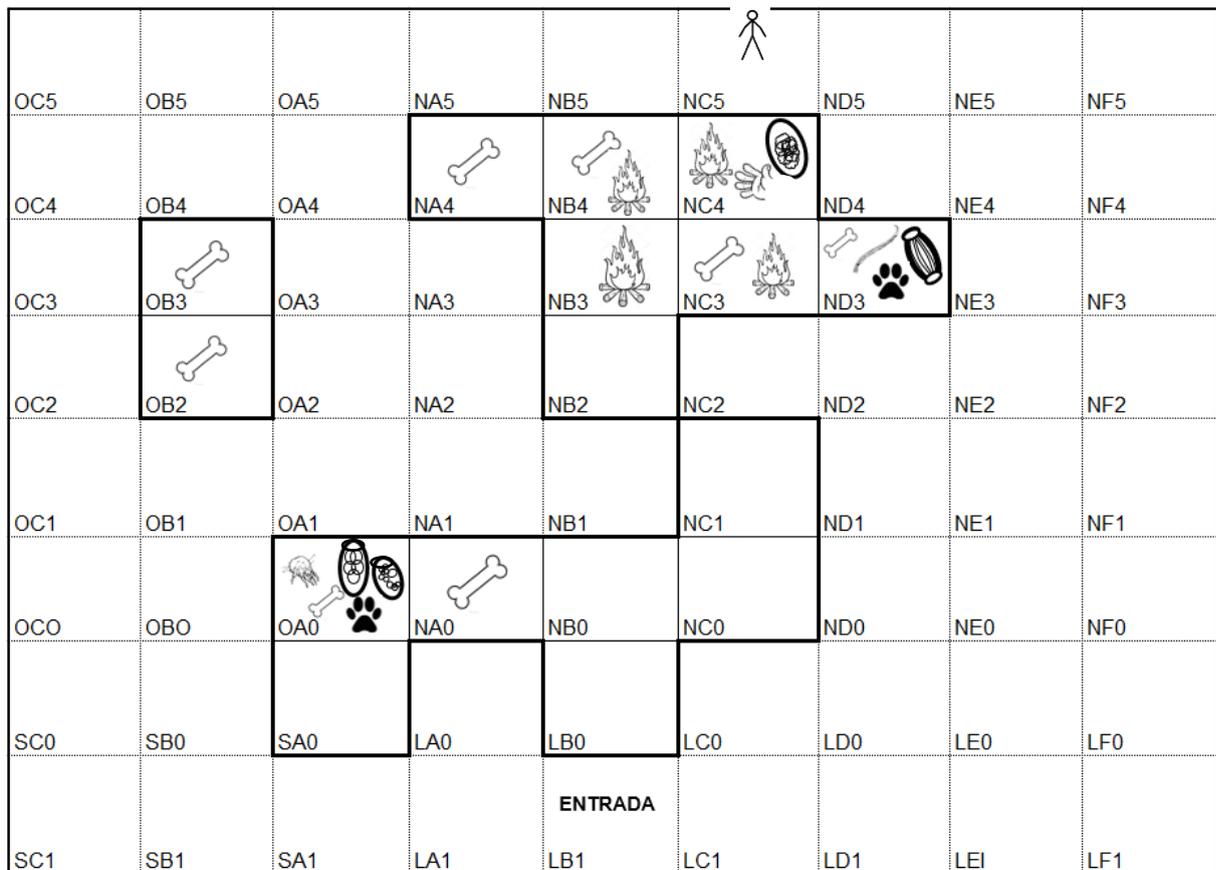


Figura 26: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 10/20cm.

- | - Delimitação dos setores onde foram encontrados coprólitos durante as escavações.
-  - Representação de larva de taxonomia indeterminada.
-  - Representação de ovo de capilarídeo.
-  - Representação de ácaro.
-  - Representação de ovo de ancilostomídeo.
-  - Representação de ovo de *Spirometra* sp.
-  - Representação do ovo de *Echinostoma* sp.
-  - Representação de felino segundo a paleogenética.
-  - Representação enterramento humano
-  - Fogueira



- Representação de humano segundo a paleogenética

Atualmente, infecções por capilarídeos foram registrados em felinos silvestres no Sudeste do Brasil, como *Leopardus gruttus*, *L. pardalis*, *L. wiedii* e *P. concolor*, encontrados principalmente na Mata Atlântica. Felinos são considerados animais de topo de cadeia, por este motivo, predam diversos animais que circulam em ambientes distintos e que podem estar infectados com parasitos (92,93).

No setor ao norte de ND3, foi documentada uma perturbação do enterramento de 1 indivíduo por algum animal logo após o sepultamento. Se sugere que um carnívoro atraído pelos vestígios humanos do enterramento, alterou o setor com o objetivo de se alimentar. A identificação do coprólito como de *Panthera onca*, indica a possibilidade deste grande felino ter sido o responsável pela perturbação. Mais profundamente, de 40 a 50 cm (Figura 27), o terceiro coprólito do setor foi recuperado em estrato associado ao horizonte caçador-coletor, com datação de até 8.125 A.P. O coprólito possuía larvas de taxonomia indeterminada e origem humana. Dada a decorrência de enterramentos íntegros nos estratos de 10 a 60 centímetros, a possibilidade de perturbação em estratos profundos, foi descartada.

OC5	OB5	OA5	NA5	NB5	NC5	ND5	NE5	NF5
OC4	OB4	OA4	NA4	NB4	NC4	ND4	NE4	NF4
OC3	OB3	OA3	NA3	NB3	NC3	ND3	NE3	NF3
OC2	OB2	OA2	NA2	NB2	NC2	ND2	NE2	NF2
OC1	OB1	OA1	NA1	NB1	NC1	ND1	NE1	NF1
OCO	OBO	OA0	NA0	NB0	NC0	ND0	NE0	NF0
SC0	SB0	SA0	LA0	LB0	LC0	LD0	LE0	LF0
SC1	SB1	SA1	LA1	LB1	LC1	LD1	LE1	LF1

ENTRADA

Figura 27: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 40/50cm.

┆ - Delimitação dos setores onde foram encontrados coprólitos durante as escavações.

-  - Representação de ovo de capilarídeo.
-  - Representação enterramento humano
-  - Fogueira
-  - Representação de humano segundo a paleogenética
-  - Representação de bovídeo segundo a paleogenética

Os setores que apresentavam a fogueira datada em 8.125 A.P. são: NC4, NB4, NB3 e NC3. Foram recuperados coprólitos nos 4 setores e resultados paleoparasitológicos positivos identificados em 2, NB4 e NC4. No setor NB4, foram coletados coprólitos de 7 camadas, com identificação paleoparasitológica em 3 amostras. Na primeira camada, a amostra positiva para um ovo de capilarídeo foi identificada com origem de *Bos taurus* (Figura 33). Espécies de capilarídeos em gado de pecuária foram registradas mundialmente, e no Brasil, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (94–96). Devido a sua localização superficial, um evento de perturbação local pode ter ocorrido tanto na época do contato europeu, com a introdução do gado no país, (97) quanto durante o processo de escavação.

Na profundidade de 20 a 30 cm (Figura 28) e 30 a 40 cm (Figura 29), com e datação de até 8.125 A.P., os dois coprólitos identificados possuem origem humana e a presença de ovos de tricostrongilídeos. Na GGII, estudos anteriores demonstraram a infecção por tricostrongilídeos em coprólitos humanos e em um indivíduo semi mumificado datado em 3.490 A.P. (98,99). Devido à localização estratigráfica e à presença de enterramentos íntegros entre 20 e 60 cm, qualquer evento de perturbação foi descartado e limitado somente à camada mais superficial. O presente estudo confirma uma persistência de infecção por tricostrongilídeos no povo da GGII pelo menos desde 8.125 A.P.

OC5	OB5	OA5	NA5	NB5	NC5	ND5	NE5	NF5
OC4	OB4	OA4	NA4	NB4	NC4	ND4	NE4	NF4
OC3	OB3	OA3	NA3	NB3	NC3	ND3	NE3	NF3
OC2	OB2	OA2	NA2	NB2	NC2	ND2	NE2	NF2
OC1	OB1	OA1	NA1	NB1	NC1	ND1	NE1	NF1
OCO	OBO	OA0	NA0	NB0	NC0	ND0	NE0	NF0
SC0	SB0	SA0	LA0	LB0	LC0	LD0	LE0	LF0
SC1	SB1	SA1	LA1	LB1	LC1	LD1	LE1	LF1

Figura 28: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 20/30cm.

-  - Delimitação dos setores onde foram encontrados coprólitos durante as escavações.
-  - Ovo de *Trichostrongylus* spp.
-  - Representação enterramento humano
-  - Fogueira
-  - Representação de marsupial segundo a paleogenética
-  - Representação de humano segundo a paleogenética

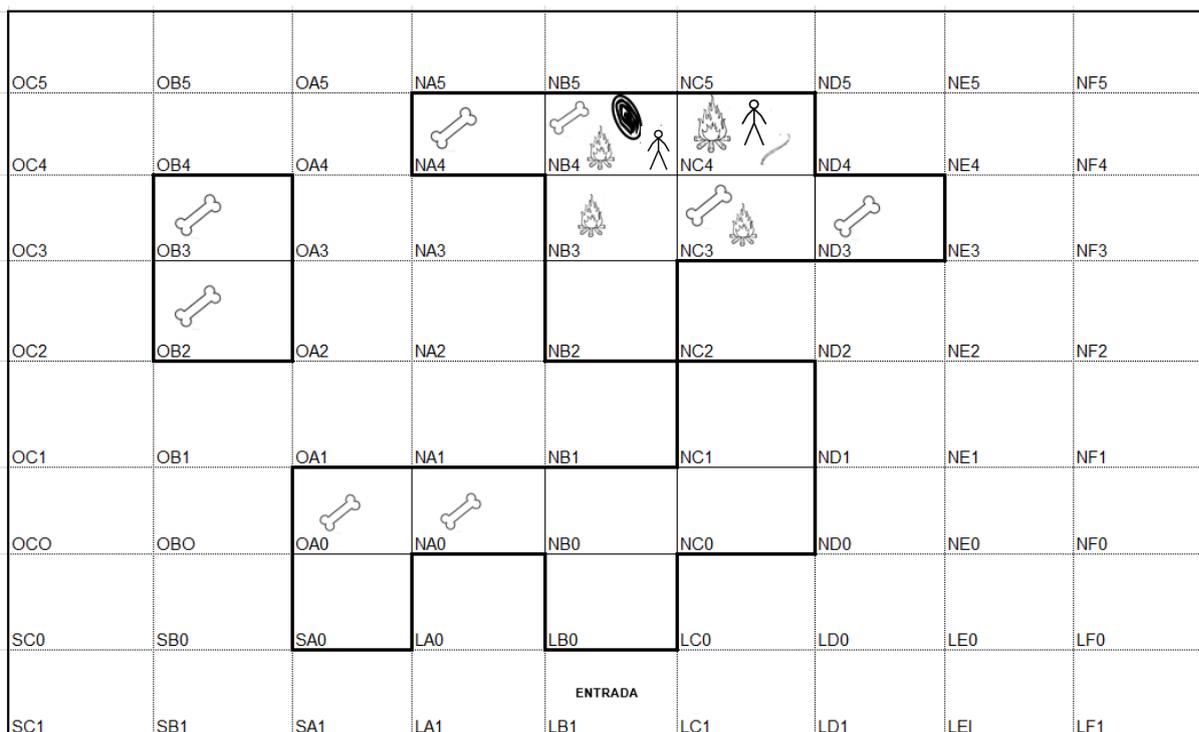


Figura 29: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 30/40cm.

-  - Delimitação dos setores onde foram encontrados coprólitos durante as escavações.
-  - Ovo de *Trichostrongylus* spp.
-  - Representação enterramento humano
-  - Fogueira
-  - Representação de humano segundo a paleogenética

No segundo setor associado à fogueira, NC4, foram recuperados coprólitos em 6 camadas, e resultados paleoparasitológicos positivos em 3. O primeiro coprólito, localizado no estrato de 10 a 20 cm (Figura 26), continha um ovo de ancilostomídeo e a identificação molecular de origem humana. O segundo coprólito, também de origem humana, foi encontrado a 30 a 40 cm (Figura 29) com a presença de larvas nematoides. Análises moleculares posteriores serão necessárias para identificar se estas são de vida livre ou de um estágio evolutivo parasitário. O terceiro coprólito, estava localizado a uma profundidade de 40 a 50 cm, sua origem foi identificada como de *Bos taurus* (Figura 27). Devido à falta de datação dos estratos deste setor e nenhum enterramento articulado, sugerimos que um evento de perturbação possa ter ocorrido no momento da escavação, visto que períodos de desmoronamentos foram reportados no setor pela equipe de arqueólogos. Desta maneira, há uma possibilidade de que os resultados paleoparasitológicos das camadas superiores, possam estar

relacionados a um evento pós contato. Apesar de infecções humanas por ancilostomídeos, já serem reportadas nos primeiros estudos paleoparasitológicos do sítio (98,99).

No setor NA4, que está situado ao oeste do setor NB4 onde está localizada a fogueira associada ao horizonte caçador-coletor, foram encontrados enterramentos articulados nos estratos de 5 a 80 cm. Entretanto, na profundidade de 80 a 90 cm, o único coprólito do setor revelou a origem de *Bos taurus* e a presença de larvas nematoides (Figura 30). Enterramentos íntegros foram coletados nas camadas superiores a este achado, assim, sugerimos que um evento de perturbação local ocorreu quando o extrato ficou exposto a desmoronamentos durante as campanhas de escavação.

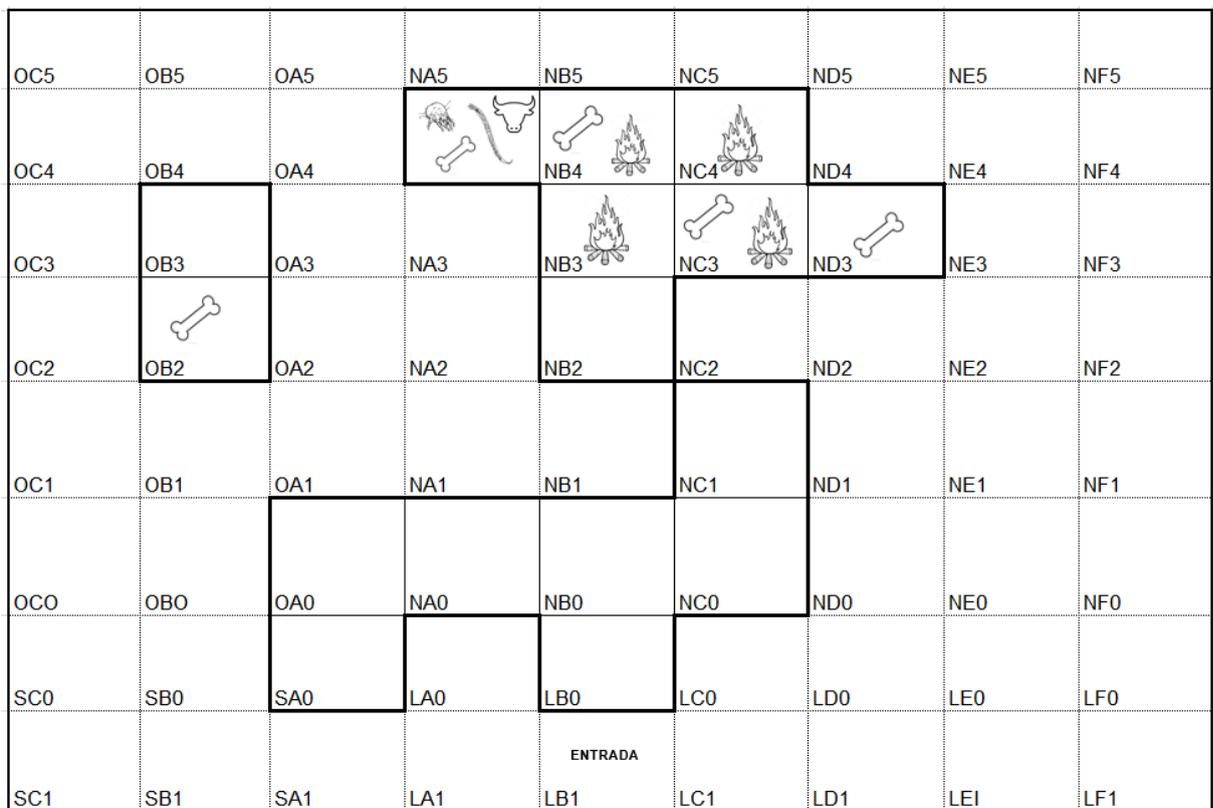


Figura 30: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 80/90cm.

-  – Delimitação dos setores onde foram encontrados coprólitos durante as escavações.
-  – Representação de larva de taxonomia indeterminada
-  - Representação de ácaro
-  - Representação enterramento humano
-  - Fogueira



- Representação de bovídeo segundo a paleogenética

O setor OB3 está localizado ao oeste da GGII, o mais distante da fogueira. Apresentou coprólitos em 4 camadas distintas e larvas de taxonomia indeterminada em coprólito de *P. opossum*, marsupial com ampla distribuição nos biomas do Brasil, inclusive no Cerrado (88). Esta amostra foi encontrada em uma profundidade de 30 a 40 cm (Figura 29) e datação de até 3.490 A.P., associado ao horizonte horticultor. Neste setor também foram escavadas séries esqueléticas completas entre as profundidades de 5 a 70 cm, o que descarta qualquer possibilidade de perturbação.

Os setores LB0, NB0 e OA0 estão localizados próximos à entrada da GGII. No setor LB0, um ovo de ancilostomídeo foi encontrado em coprólito humano na profundidade de 50 a 60 cm (Figura 31), como é relatado na literatura para este sítio. O setor NB0, apresentou um coprólito de origem humana, positivo para larvas de nematoides na camada de profundidade de 20 a 30 cm (Figura 28).

OC5	OB5	OA5	NA5	NB5	NC5	ND5	NE5	NF5
OC4	OB4	OA4	NA4	NB4	NC4	ND4	NE4	NF4
OC3	OB3	OA3	NA3	NB3	NC3	ND3	NE3	NF3
OC2	OB2	OA2	NA2	NB2	NC2	ND2	NE2	NF2
OC1	OB1	OA1	NA1	NB1	NC1	ND1	NE1	NF1
OCO	OBO	OA0	NA0	NB0	NC0	ND0	NE0	NF0
SC0	SB0	SA0	LA0	LB0	LC0	LD0	LE0	LF0
				ENTRADA				
SC1	SB1	SA1	LA1	LB1	LC1	LD1	LE1	LF1

Figura 31: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 50/60cm.

- Delimitação dos setores onde foram encontrados coprólitos durante as escavações.
- Representação de ovo de ancilostomídeo.
- Representação enterramento humano
- Fogueira
- Representação de humano segundo a paleogenética

O setor OA0, localizado na região oeste da entrada principal, continha coprólitos em 3 estratos, 2 positivos para a análise paleoparasitológica. A primeira amostra, localizada superficialmente, com larvas nematoides e origem de *Bos taurus*, representa outro evento localizado de perturbação pós-contato (Figura 32). O segundo coprólito, determinado como de *Leopardus pardalis* e positivo para *Spirometra* spp., estava localizado a uma profundidade de 10 a 20 cm e datação de até 3.490 A.P. (Figura 26). Espécies de *Spirometra* foram registradas em felinos silvestres das regiões Sul e Sudeste do país, inclusive em *L. pardalis* no estado de Minas Gerais (100,101). Devido à presença de enterramentos articulados entre as profundidades de 10 a 60 cm, eventos de perturbação foram descartados.

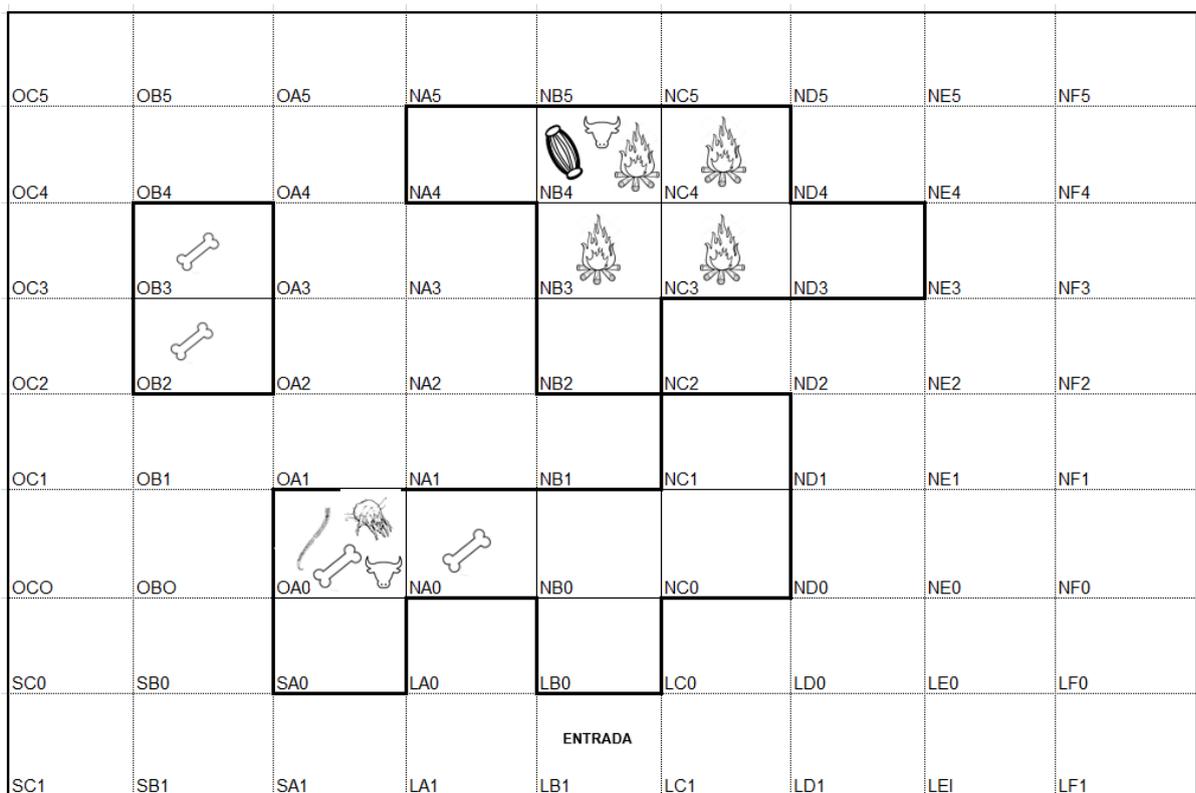


Figura 32: Representação espacial da análise integrada por setor no estrato de 5/10cm.

- 
 – Delimitação dos setores onde foram encontrados coprólitos durante as escavações.
- 
 – Representação de larva de taxonomia indeterminada.
- 
 - Representação do ácaro.
- 
 – Representação de ovo de capilarídeo.
- 
 - Representação enterramento humano
- 
 - Fogueira



- Representação de bovino segundo a paleogenética

A morfologia dos coprólitos identificados como de humanos contendo ovos de ancilostomídeos foram bem diferentes neste estudo das já relatadas anteriormente (Figura 25). Assim como a maioria dos coprólitos identificados, esta diferença pode estar relacionada a fatores tafonômicos ou de perturbação. Toda a diversidade de coprólitos encontrada, morfológica e morfometricamente, corrobora tanto com os resultados paleoparasitológicos, quanto com os paleogenéticos, já que em um contexto primariamente humano, diversos outros animais foram identificados.

5.2 Paleoparasitologia

Coprólitos são fonte de estudo para pesquisas paleoparasitológicas desde o começo do século, proporcionando informação de uma diversidade de parasitos e hospedeiros. Coprólitos podem ser encontrados em vários ambientes diferentes, como dentro de corpos mumificados e latrinas, mas a melhor preservação de material arqueológico se encontra dentro de cavernas e abrigos feitos de pedra, como observados no sítio arqueológico do presente estudo (102–104).

Foi observada uma grande variedade de ovos de helmintos na análise paleoparasitológica. A presença de microorganismos como fungos e bactérias, comumente encontrados em vestígios arqueológicos, degradam o material e podem persistir na inativação de macromoléculas, mesmo depois de estacionados em baixas temperaturas. Para diminuir o tempo de reidratação e conseqüentemente diminuir a proliferação de microorganismos sem alterar a análise paleoparasitológica, o tempo de 48h de reidratação se mostrou eficaz, pois foi possível recuperar uma maior quantidade de microvestígios do que a reidratação de 24h e 72h. Este teste de tempo de reidratação foi observado como eficiente nesta pesquisa, e é necessário avaliar o impacto nas análises paleogenéticas posteriores.

A presença de coprólitos contendo ovos de parasitos em épocas tão distintas cronologicamente e culturalmente, nos proporciona informações paleoecológicas antes, durante e depois do desenvolvimento da tradição Una no Brasil. Coprólitos de origem humana já eram esperados por conta do contexto arqueológico previamente estudado (98,99), mas a hipótese da presença de animais de diversas espécies, dada a grande diversidade de morfologia e morfometria de todas as amostras, foi

confirmada. Além de identificar uma diversidade de hospedeiros, houve também riqueza parasitária, o que sugere que estes parasitos estavam presentes na GGII, durante praticamente todo o período que esta foi utilizada para fins funerários.

Os coprólitos associados à fogueira, que apresentaram parasitos como tricostrongilídeos e capilarídeos, estavam próximos a um local de grande circulação. Tricostrongilídeos e capilarídeos são geohelmintos, ou seja, necessitam que uma parte do ciclo biológico aconteça no solo, com temperaturas entre 17° e 30°C e uma alta taxa de umidade para desenvolvimento (13).

Os nematódeos da família Trichostrongylidae, do gênero *Trichostrongylus*, acometem o trato respiratório e digestivo de um amplo espectro de espécies de animais. Além dos humanos, parasitam desde caprinos e equinos à aves e mamíferos de pequeno porte, com maior distribuição entre os herbívoros. Espécies como *T. orientalis*, *T. vitrinus*, *T. axei*, *T. capricola*, *T. probolurus*, *T. skrjabin* e *T. colubriformis* podem parasitar humanos (105–107). Os parasitos adultos se encontram no epitélio intestinal durante todos os estágios de desenvolvimento. O agravamento da doença, a tricostrongilose, tanto em humanos quanto em animais, está relacionada à adultos no intestino delgado que podem causar severa enterite, resultando em falta de apetite, diarreia, perda de proteínas endógenas, comprometimento na absorção de alimentos e dor abdominal (105,108).

Uma análise paleopatológica dos restos humanos de enterramentos de GGII, seria necessária para corroborar com dados do estado de saúde e infecção parasitária. Recentemente um estudo demonstrou a presença de marcadores osteológicos de estresse, nutrição e infecção (*cribra orbitalia* e hiperostose porótica) em indivíduos indígenas pertencentes aos grupo Tenetehara-Guajajara infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), em época pós contato aos europeus no Brasil (109).

O sucesso de desenvolvimento do parasito está relacionado às condições de temperatura e umidade ideais em que as larvas de estágio de vida livre se encontram. Estas condições possuem grande influência na epidemiologia de helmintos gastrointestinais (106). A infecção por *Trichostrongylus* spp., ocorre por meio de ingestão da larva infectante L3. Em humanos e animais, normalmente acontece pelo consumo de água ou alimentos contaminados (105,110).

Na atualidade, infecções humanas por *Trichostrongylus* spp. foram observadas em Laos, Tailândia, China, África do Sul, Egito, Peru e no Brasil, tanto em populações rurais, quanto urbanas (105,111,112). Infecções por enteroparasitos ainda são um

problema em países em desenvolvimento, diretamente relacionado a problemas socioeconômicos e culturais. Uma maior prevalência da infecção se reporta em regiões rurais onde há um maior contato com animais herbívoros e o solo (105,112,113).

Em estudos paleoparasitológicos, ovos de tricostrongilídeos têm sido reportados em vários lugares do mundo. No Velho Mundo, Sianto e colaboradores (114) descrevem ovos pertencentes ao gênero *Trichostrongylus* em sedimentos coletados da região pélvica de indivíduos provavelmente pertencentes a idade média ou século IX em Portugal. Assim como Seo e colaboradores (115) descrevem ovos e larvas do parasito em múmias da Dinastia Joseon na Coréia. No Novo Mundo, Reinhard e colaboradores (116) descrevem o achado do parasito em coprólitos humanos de um sítio arqueológico dos Estados Unidos, datado em 6.800 a 4.800 A.P. Fugassa e colaboradores (117) relatam a presença de um ovo fraturado identificado como de tricostrongilídeo em material da Patagônia, cujos estratos estão datados ente 9.700 e 3.400 A.P., porém, a origem do material analisada por meio da identificação morfológica do coprólito, permanece indeterminada entre humana ou canina.

De Souza e colaboradores (105) também relatam a presença de ovos deste parasito em coprólitos do período pré-inca em sítio arqueológico localizado no Chile. Até a revisão de Gonçalves e colaboradores (118), os únicos achados do parasito estavam restritos ao Novo Mundo, distribuídos no Chile, México, Argentina, Brasil e Estados Unidos, atribuídos ao consumo de animais silvestres como cervídeos.

No Brasil, o único achado paleoparasitológico de *Trichostrongylus* sp., realizado por Araújo e colaboradores (119), provém de corpos mumificados pertencentes ao século XVIII. O presente estudo, revela o achado mais antigo de ovos de *Trichostrongylus* sp. no Brasil, cuja origem humana é confirmada pela análise paleogenética. Dez espécies de *Trichostrongylus* já foram descritas parasitando humanos, as espécies *T. colubriformis* e *T. orientalis* são as mais comumente encontradas ao redor do mundo (107,110,111). Em países como Coréia, Irã e em todo continente americano, infecções humanas são geralmente relacionadas a um maior contato com animais herbívoros (111,120). Desta forma, os ovos de tricostrongilídeos identificados neste estudo, pertencem a algumas destas espécies. A determinação a nível de espécie acontece por meio da análise taxonômica de adultos e molecular de parasitos (111,120).

Existem mais de 300 espécies da família Capillariidae, descritas em diversas classes de vertebrados distribuídos pelo mundo (121). São amplamente reportadas

em anfíbios, peixes, répteis, aves e mamíferos, podendo ter ciclo biológico tanto monexênico como heteroxênico. Algumas espécies são descritas com importância econômica por serem patogênicas em humanos. Dada a variação de i) Morfometria do parasito, ii) Especificidade de Hospedeiro e iii) Especificidade de Habitat, a classificação das espécies tem sido bastante complicada (121,122).

Em algumas espécies de parasitos, como *Calodium hepaticum*, a infecção ocorre quando o hospedeiro ingere ovos fecundados embrionados presentes no meio ambiente, proveniente de fezes contaminadas. Por meio de desenvolvimento no solo, o ovo se torna embrionado, portanto, infectivo. Dentro do organismo do hospedeiro, se desenvolve e se estabelece no fígado de animais e seres humanos. A ingestão de ovos fecundados, mas não embrionados, quando o hospedeiro se alimenta da carcaça de animais com fígado contendo o parasito, pode caracterizar um falso parasitismo, onde o desenvolvimento embrionário só irá ser completo com o contato do ovo com o solo (123).

Animais são importantes no ciclo parasitário da *C. hepaticum*, já que estes possuem um grande potencial zoonótico. Comumente associados a infecções em canídeos, felinos, suínos, roedores e em primatas (124,125). Casos esporádicos de infecções têm sido relatados ao redor do mundo na atualidade, em países como a Turquia, em regiões remotas como a Sibéria, e em países tropicais como o Brasil (126–128). A presença de ovos de capilarídeos em fezes de populações amazônicas e do sul do Brasil, foram descritas. Estas populações possuem o costume de ingerir carne de caça que muitas vezes se encontra malcozida. Fezes contendo ovos fecundados mas não embrionados dos parasitos entram em contato com o solo, estes se tornam infectivos, quando ingeridos, podem causar a capilariose hepática (129–131).

A *C. hepaticum* é reportada em diversos animais no Brasil. Canídeos e felinos (93), roedores nas regiões amazônicas (132), ratos domésticos no sudeste do Brasil (133), canídeos silvestres (134), em espécies distintas de morcegos (134) entre outros. Em felinos silvestres, já foram registrados diversos parasitos em material fecal, inclusive capilarídeos de felinos na Mata Atlântica (92,135). Adicionalmente, infecções em marsupiais, são amplamente registrados no país (136), tanto em regiões de mata de galeria (137) quanto nas grandes capitais das regiões sul e sudeste do Brasil, parasitando espécies de *Didelphis albiventris* (89–91).

Em animais de pecuária também é descrita a presença de capilarídeos, em criação de ovinos, inclusive em cortes de vísceras com propósito econômico (138),

bovinos em diversos países incluindo Japão (94), Estados Unidos (95) e no Brasil em animais adultos e bezerros, onde na maioria dos casos existe coinfeção com outros parasitos, incluindo espécies de *Trichostrongylus* (96,139,140).

Segundo Moravec (64), existem mais de 10 gêneros com diversas espécies da família Capillariidae que podem infectar mamíferos. O parasito que mais se encontra parasitando ruminantes e animais da família Bovidae é do gênero *Aonchotheca* espécie *bovis* (syn. *Capillaria bovis*) (141–144). Enquanto que em felinos, os gêneros e espécies mais encontrados são: *Pearsonema feliscati* (syn. *C. feliscati*), *Pearsonema plica* (syn. *C. plica*), *Eucoleus aerophilus* (syn. *C. aerophila*), *Aonchotheca erinacei* (syn. *C. erinacei*), *Eucoleus boehmi* (syn. *C. boehmi*) e *Calodium hepaticum* (syn. *C. hepatica*) (135,145–149). Em marsupiais, os parasitos da família Capillariidae que foram identificados, pertencem a mais de 13 espécies do gênero *Eucoleus*, assim como espécies dos gêneros *Baruscapillaria*, *Aonchotecha* e *Capillaria* (89,121).

Em contexto arqueológico, espécies de capilarídeos são reportados no Velho Mundo. Bouchet e colaboradores (150,151) discorrem sobre a presença de ovos do parasito com até três morfotipos distintos em coprólitos humanos de sítio da França, datado em até 3.200 A.P., com base na ornamentação externa da casca do ovo, podendo ser indício de hospedeiros diferentes. Na idade do bronze, coprólitos de ovelhas no Irã demonstraram 3 ovos com morfologias externas diferentes, sugestivas de espécies distintas (152).

No Novo Mundo, coprólitos de diferentes animais, incluindo canídeos, felinos, ungulados de até 8.000 A.P., carnívoros e cervídeos do Holoceno na Patagônia e no Peru, foram analisados e identificados com a presença de ovos de capilarídeos (86,153–157). No Brasil, existe apenas 1 achado de ovos de capilarídeos em coprólitos do nordeste Brasileiro. Sianto e colaboradores (158) descrevem a presença de diversos capilarídeos e de outros parasitos como *Spirometra* sp. em coprólitos de felinos localizados em camadas estratigráficas datadas em até 9.150 A.P., encontrados no Parque Nacional Serra da Capivara.

No presente estudo, foram identificados quatro morfotipos de ovos de capilarídeos em contexto arqueológico no Brasil, com dados que sugerem a presença e circulação de diferentes espécies de parasitos em hospedeiros distintos.

Espécies de *Spirometra* infectam em maior quantidade felinos e canídeos. Nos países asiáticos, usualmente é encontrada a espécie *Spirometra mansoni*, quanto que no continente americano, a espécie *Spirometra mansonioides* é mais comum. O ciclo

biológico de ambas espécies necessita de dois hospedeiros intermediários, o invertebrado aquático que pode ser um crustáceo copépodo, onde ocorrerá o desenvolvimento da fase larvar denominada procercóide. O crustáceo é predado pelo segundo hospedeiro intermediário que pode ser um anfíbio, réptil ou mamífero, geralmente de pequeno porte, ocasionando o desenvolvimento da fase procercóide em plerocercóide. A segunda fase larvar infectiva, atinge seu hospedeiro definitivo, geralmente um felino quando este preda o segundo hospedeiro intermediário, completando seu desenvolvimento até a fase adulta. O homem entra no ciclo evolutivo do parasito como hospedeiro acidental, a larva plerocercóide pode desenvolver a doença chamada esparganose (159,160).

Segundo Meyer (159), quando a fase plerocercóide infectante chamada também de *Sparganum*, alcança o seu hospedeiro definitivo, os parasitos adultos podem estimular processos inflamatórios por meio de ação mecânica no intestino. A larva migra até a parede intestinal e se estabelece no tecido subcutâneo ou muscular, onde irá atingir a maturidade. No homem, a infecção por *Spirometra* spp., se adquire por ingestão de água contaminada com copépodos infectados contendo o primeiro estágio larvar, ou por meio de carne malcozida de animais com o segundo estágio larvar. Além de acometer o intestino, a larva plerocercóide pode se alojar em tecido ocular, pulmonar, facial, neurológico entre outros (161–164).

Como um dos hospedeiros definitivo, casos de infecção em felinos são descritos em todo o mundo, a presença de ovos de *Spirometra* spp. foram identificadas desde em grandes felinos como leões da savana africana, felinos de pequeno porte domésticos da Coréia e Estados Unidos, até felinos selvagens nas ilhas Cayman da América Central (165). Na América do Sul, já foram relatados casos de infecções em raposas na Argentina. No Brasil, casos foram identificados com a presença de ovos de *Spirometra* spp. nas fezes, ou parasitos adultos no intestino, tanto em pequenos mamíferos como didelfídeos, quanto em onças pintadas da Mata Atlântica (160,165–168).

Ovos de *Spirometra* spp. foram encontrados em associação com outros parasitos de animais em coprólitos de felinos datados em 9.000 A.P., localizados em sítio arqueológico no parque nacional da Serra da Capivara, nordeste do Brasil. Assim como o bioma Cerrado, a Caatinga brasileira abriga e registra a presença de grandes felinos incluindo a Jaguaritica. O achado deste estudo é o segundo registo da presença de espécies de *Spirometra* em felinos no período pré-colombiano do Brasil. A distância geográfica e particularidade climática e vegetal de cada bioma, demonstra

que em tempos remotos, o parasito possuía uma ampla distribuição e possivelmente em espécies de hospedeiros distintos, como *Leopardus tigrinus*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Puma yaguaroundi*, *Panthera onca* e *Puma concolor*, citados em Sianto e colaboradores (158). Não pode ser descartada a possibilidade deste parasito circular entre populações pré-históricas não só animais, como humanas (12,161).

Espécies do gênero *Echinostoma* são trematódeos digenéticos hermafroditas que habitam o intestino de mamíferos e aves, ocasionalmente infectam humanos. A maioria das espécies não possui especificidade ao hospedeiro final, e por isso são encontrados em uma diversidade de animais silvestres e domésticos (62). Na identificação taxonômica das espécies, são observados caracteres como: morfologia das cercarias, tamanho dos 37 espinhos no colar cefálico dos adultos e aspectos do ciclo evolutivo (66). Espécies como *Echinostoma caproni* e *E. trivolvis* já foram identificados parasitando roedores, musaranhos, patos domésticos e cisnes (66,69).

No ciclo evolutivo de *Echinostoma* spp., são liberados junto aos dejetos de aves ou mamíferos, ovos do parasito em lagos ou córregos. Na água, os ovos fertilizados demoram até 3 semanas para atingirem o estágio de miracídio, que acontecerá mais rapidamente quando a temperatura da água estiver em torno de 26° a 28°C. Os miracídios penetram em caracóis geralmente da espécie *Biomphalaria glabrata* e se desenvolvem em cercarias que permanecerão encistadas nos rins até serem predados pelo segundo hospedeiro intermediário. Estes podem ser desde outras espécies de caracóis, até anfíbios e peixes. O parasito atinge seu hospedeiro definitivo quando mamíferos e aves predam o segundo hospedeiro intermediário com cistos de metacercária. Os cistos irão se desincistar no intestino e se desenvolver em parasitos adultos, dando continuidade ao ciclo evolutivo (66).

Apesar de não existir atualmente registros de felinos no Brasil infectados com espécies de *Echinostoma*, Sianto e colaboradores (169), identificaram um ovo com medidas correspondentes a das espécies *E. erraticum* e *E. neglectum* em coprólitos de felinos. Estas duas espécies são comumente identificadas em aves. Desta forma, os autores concluíram que o caso poderia ser caracterizado como falso parasitismo, onde o felino pôde ter predado a ave que já albergava a fase adulta do parasito.

Dentre as oito espécies de *Echinostoma* identificadas na América do Sul, três foram reportadas em mamíferos de Minas Gerais: *E. echinatum*, *E. paraensei* e *E. rodriguesi* (Syn. *E. trivolvis*). Por estes parasitos não possuírem um hospedeiro definitivo conhecido e parasita diversos animais, incluindo felinos, a possibilidade de infecção verdadeira não é descartada. A morfometria dos ovos de *Echinostoma* spp.

no presente estudo corresponde a descrita para as espécies *E. paraensei* e *E. rodriguesi* (Syn. *E. trivolvis*) (66,67,69,170).

Ancylostoma duodenale e *Necator americanus* são espécies de ancilostomídeos considerados específicos de humanos e de primatas não humanos, filogeneticamente próximos. O primeiro com possível origem na Ásia e o segundo na África. Ambas espécies podem ser identificadas em um mesmo indivíduo. Os ancilostomídeos são pequenos vermes que se fixam na vilosidade intestinal do hospedeiro para se alimentar de sangue, algumas espécies de outros animais como canídeos, conseguem penetrar na pele, porém sem concluir o ciclo evolutivo, as chamadas *larvas migrans* (171).

Infecções por ancilostomídeos são consideradas doenças tropicais negligenciadas e estima-se que atualmente um bilhão de pessoas estejam parasitadas, principalmente em países subdesenvolvidos (172). Indivíduos com a presença da larva apresentam quadro de dor abdominal, enjoou e severa deficiência em ferro. Anemia se manifesta quando existe uma grande carga parasitária com duração de infecção persistente. A eclosão da larva está diretamente relacionada a temperatura, tipo e porcentagem de umidade do solo. Nestas circunstâncias, o ovo depositado no solo irá desenvolver na primeira fase larvar. A larva se alimentará dos compostos orgânicos e chegará ao estágio infectivo, para então penetrar o tecido epitelial principalmente de indivíduos que não utilizam calçados (172,173).

Elevadas altitudes e baixas temperaturas (<20°), limitam a transmissão do parasito, desta forma, a migração lenta dos caçadores-coletores que durou várias gerações na Beríngia para posterior introdução e povoamento das Américas, serviu como “filtro” para algumas infecções parasitárias, incluindo a por ancilostomídeos em humanos. O povoamento da América por vias alternativas não pode ser descartada, principalmente com achados arqueológicos de larvas de ancilostomídeos que assim como *A. duodenalis*, originado de climas subtropicais asiáticos, necessitam de temperaturas maiores que 20°C para desenvolvimento (14). Este clima subtropical se assemelha com a temperaturas do Sudeste do Brasil, e em Minas Gerais, o clima semiúmido diferente da Amazônia brasileira, proporciona que larvas deste parasito pudessem se adaptar bem ao solo do Cerrado, sendo bem exemplificado pela presença dos dois achados de ancilostomídeos de origem humana no interior e GGII neste estudo. Não só a possibilidade de espécies destes parasitos estarem circulando nos proporciona informações paleoecológicas, mas demonstra a manifestação cultural de que esta população estaria andando de pés descalços.

Estudos anteriores já demonstraram a presença de ancilostomídeos em materiais arqueológicos no Novo e Velho Mundo. No Brasil, existem achados em sítio localizados de Norte ao Sul do país, com o mais antigo datado em 7.230 A.P. no Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí. No estado de MG, a presença do parasito já foi reportada no sítio Boqueirão Soberbo e nos primeiros estudos arqueológicos de sedimento sacral e coprólitos do sítio GGII, conduzido pelo Dr. Luiz Fernando Ferreira, na década de 80. O primeiro estudo publicado em revista científica sobre material arqueológico no Brasil, foi relatado por Fernandes e colaboradores (174) na Fundação Oswaldo Cruz. O artigo descreve a identificação de sete amostras de coprólitos contendo ovos de tricurídeos e ancilostomídeos, incluindo a identificação de possíveis larvas nematoides (98,99,118).

5.3 Paleogenética

Não é comum encontrar estudos que correlacionem dados arqueológicos e moleculares para a identificação da origem de coprólitos em sítios arqueológicos.

Geralmente, características morfológicas, químicas, palinológicas, dieta e de inclusões são analisados, além da comparação com dejetos animais e humanos na atualidade. Da mesma forma, uma análise de possíveis resquícios deixados pelo hospedeiro, como no caso de humanos, também são registrados, a exemplo de vestígios de fogueira, intimamente relacionada com ocupação humana (175–177).

Com a utilização de métodos para a recuperação de ovos de parasitos em material arqueológico, como a técnica de concentração de Lutz, estudos paleoparasitológicos em coprólitos, começaram a identificar quantitativamente ovos de parasitos. Apesar dos avanços, a dificuldade de conhecer a origem zoológica do material, persistia. Desta forma, identificações morfológicas para obter mais informações sobre os coprólitos foram aplicadas, integrando dados paleoparasitológicos com a morfometria e morfologia de parasitos espécie-específicos (36).

Hunt e Lucas (178) estabelecem uma identificação de “produtores de coprólitos”. Os autores relatam a dificuldade de identificar a origem, e propõem atributos gerais que podem ser utilizados para a caracterização do material. São levados em consideração a profundidade estratigráfica, tamanho, constituição química, conteúdo interno e abundância. Adicionalmente, atributos específicos como morfologia e constituição bioquímica são acrescentados.

Este modelo de análise é utilizado por vários autores como uma forma alternativa à identificação molecular. Reinhard e colaboradores (116), fizeram a correlação entre ossos encontrados dentro de coprólitos e ossos recuperados nos estratos dos sítios arqueológicos *Hinds Cave* e *Dust Devil Cave*, com evidência de assentamento humano. Ferreira e colaboradores (104) identificaram coprólitos de origem humana no Nordeste do Chile, dada a presença de carvão e partículas de quartzo em sua constituição. Assim como em trabalho posterior, onde os autores propõem a origem humana das amostras de coprólitos datados em 11,060 a 11,040 A.P. pela proximidade com enterramentos humanos (179).

Atualmente, alguns autores ainda utilizam a identificação morfológica e morfométricas juntamente a aspectos químicos e físicos de componentes da dieta do hospedeiro para a identificação da origem do coprólito, sem utilizar de técnicas da biologia molecular (86,180,181). Porém, as técnicas moleculares são empregadas como uma ferramenta importante na identificação de materiais arqueológicos de todos os tipos, desde pequenos ossos com boa capacidade de preservação de material genético como o osso petroso, até materiais encontrados no solo, como sedimentos de terra e coprólitos (43,182,183). O foco da maioria dos estudos em relação a identificação molecular da origem dos coprólitos, se concentra em animais da megafauna extintos em contexto paleontológico (184–186). A fauna de mamíferos de médio e pequeno porte em tempos geológicos do quaternário é pouco explorada com o uso de técnicas de biologia molecular. Pesquisadores estudam principalmente estruturas osteológicas, correlacionando em algumas das vezes, com análise de grãos de pólen e dieta dos animais (178,187).

Os únicos trabalhos recentes que correlacionam análise morfológica e morfométricas de coprólitos com a identificação molecular de mamíferos de grande, pequeno e médio porte são os de Petrih e Fugassa (188) e Fugassa e colaboradores (189). O primeiro, analisa morfológica e morfometricamente coprólitos similares a de carnívoros datados em até 5.100 anos, confirmado pela análise molecular com 99% de identidade genética com sequência de *Puma concolor* depositadas no *GenBank*. O segundo, analisa além de morfologia, morfometria e análise molecular, a paleoparasitologia de coprólitos datados em 2.900 anos. Foi identificado 99% de identidade genética com sequência de raposa-colorada depositada no *GenBank*. Ambas as classificações moleculares estão relacionadas a carnívoros de médio e grande porte encontrados na América do Sul.

Em Petrigh & Fugassa (188), os autores relatam que as amostras continham sequências com máxima de identidade genética com sequências de onças pardas (*Puma concolor*) do Brasil, geneticamente próximas às onças pardas da Patagônia.

Espécies de felinos como *Leopardus pardalis* e *Panthera onca*, cuícas da espécie *Philander opossum*, e o único marsupial do gênero *Didelphis* encontrado no Cerrado, da espécie *albiventris*, são também recuperados atualmente no estado de MG. O achado de coprólitos em época pré-colombiana destes animais, indica que estes já circulavam nesta região entre a transição Pleistoceno-Holoceno (77). A introdução de gado no Brasil data a primeira metade do século XVI, durante as grandes navegações provenientes da Península Ibérica e da Ilha do Cabo Verde, a maioria sendo gado europeu (*Bos taurus*), mas alguns exemplares eram mestiços do zebu (*Bos indicus*) (97). A presença de coprólito destes animais em camadas superficiais do sítio arqueológico, é sugestivo de contato histórico ou de perturbação do sítio. O sítio arqueológico GGII se encontra inserido dentro de uma fazenda particular que ainda opera como tal nos dias atuais. A criação de gado da espécie *Bos taurus* poderia ter sido fonte da economia local na época do Brasil colonial, onde estes pastavam nas dependências da fazenda, inclusive nas proximidades do sítio arqueológico (97).

No Brasil, não existem estudos de identificação molecular da origem animal corroborado com dados de caracterização morfológica e morfométrica de coprólitos. Entretanto, a identificação da origem humana e classificação haplotípica de ancestralidade tem sido incluída aos estudos paleoparasitológicos e paleogenéticos no país (31,109,190–194). O presente estudo, é o primeiro no Brasil que recupera sequências genéticas de animais oferecendo a oportunidade de uma identificação mais específica da origem dos coprólitos. Os estudos paleogenéticos em animais no país ainda são escassos, o entendimento da origem genética de materiais como ossos e coprólitos, associados a estudos do passado, como proposto neste trabalho, são importantes para entendimento paleoecológico.

O processo de entendimento dos tempos ancestrais, engloba uma grande interdisciplinaridade de estudos sobre dieta, afinidade cultural, abrigos, influência da arte e aspectos da vida cotidiana identificados como indicadores. Juntamente com os estudos dos parasitos circulantes, da dinâmica entre estes e seus diversos hospedeiros. A descoberta de vários componentes materiais e orgânicos nos diferentes estratos no sítio arqueológico GGII, nos proporcionar informações não só

sobre a cultura desta população e seus costumes cerimoniais, mas sobre aspectos comportamentais e de interação com diferentes animais.

No presente estudo, a identificação de 5 táxons de parasitos e 6 táxons de hospedeiros incluindo humanos, em uma cronologia de 8.125 a 3.490 A.P., proporcionou informações sobre a circulação de parasitos que podem infectar humanos dentro do espaço geográfico que frequentavam, assim como a presença de diversos animais presentes no bioma Cerrado. O estudo mostra um caráter integrativo por utilizar ferramentas paleoparasitológicas e paleogenéticas que proporcionaram informações que auxiliam a propor um cenário paleoecológico do sítio GGII.

Como perspectivas para a continuidade desta pesquisa, o espaço geográfico do sítio GGII será mais amplamente explorado, continuando com a procura de um maior entendimento da espacialidade dos setores e das camadas estratigráficas que não possuíam datações atribuídas. Adicionalmente, informações dos enterramentos humanos de GGII previamente estudados. Novas análises de remanescentes humanos e de animais do sítio arqueológico serão estudados e acrescentados. A análise paleogenética molecular será aplicada com marcadores específicos para determinação da ancestralidade das amostras humanas encontradas, assim como para a determinação de espécies e linhagens dos helmintos intestinais identificados.

6. CONCLUSÃO

- O sistema de classificação de origem de coprólitos demonstrou que uma diversidade de animais, incluindo o homem, circulavam temporalmente e espacialmente no GGII.
- A técnica de reidratação de coprólitos modificada para um período de 48h foi eficiente na recuperação de ovos de parasitos e outros microvestígios.
- A análise paleoparasitológica demonstrou uma riqueza de helmintos parasitos enzoóticos e zoonóticos, como morfotipos de *Capillariidae*, *Trichostrongylus* sp., *Ancylostomatidae*, *Spirometra* sp. e *Echinostoma* sp. em GGII.
- A análise paleogenética, por meio da abordagem de *Barcoding* de DNA, demonstrou a circulação dos animais onça pintada (*Panthera onca*), gambá de orelha branca (*Didelphis albiventris*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), e cuíca (*Philander opossum*) em GGII.

- A identificação molecular de coprólitos de gado doméstico (*Bos taurus*), espécie introduzida no Brasil no século XVI, indica uma perturbação pós- contato e restrita no sítio GGII.
- Indivíduos do sítio arqueológico GGII estavam infectados com tricostrongilídeos desde 8.125 A.P.
- A presença de marsupiais e felinos infectados por helmintos de potencial zoonótico, provavelmente possibilitou o compartilhamento de parasitos com os humanos que frequentavam GGII.
- A presença de diversos morfotipos de capilarídeos em coprólitos morfológica e geneticamente caracterizados como provenientes de onça pintada e do gambá de orelha branca, sugere infecção por diferentes espécies desta família de helmintos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araújo A, Reinhard KJ, Ferreira LF, Gardner SL. Parasites as probes for prehistoric human migrations?. *Trends Parasitol.* Março de 2008;24(3):112–5.
2. Ruffer MA. Note on the Presence of “BILHARZIA HAEMATOBIA” In Egyptian Mummied of the Twentieth Dynasty [1250-1000 B.C.]. *Br Med J.* 1º de janeiro de 1910;1(2557):16.
3. Araújo A, Reinhard K, Ferreira LF, Pucu E, Chieffi PP, Araujo A, et al. Paleoparasitology: the origin of human parasites. *Arq Neuropsiquiatr.* Setembro de 2013;71(9B):722–6.
4. Araújo A, Ferreira LF, Fugassa MH, Leles D, Sianto L, Souza SMM de, et al. New World Paleoparasitology. In: *Sanitation, Latrines and Intestinal Parasites in Past Population.* 1º ed Reino Unido: Ashgate; 2015. p. 165–86.
5. Santos AL. Os caminhos da paleopatologia: passado e desafios. 2000 [citado 8 de março de 2019]; Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/13609>.
6. Buckland W. XII.—On the Discovery of Coprolites, or Fossil Fæces, in the Lias at Lyme Regis, and in other Formations. *Trans Geol Soc Lond.* 1º de janeiro de 1829;S2-3(1):223–36.
7. Qvarnström M, Niedźwiedzki G, Žigaitė Ž. Vertebrate coprolites (fossil faeces): An underexplored Konservat-Lagerstätte. *Earth-Sci Rev.* 1º de novembro de 2016;162:44–57.
8. Szidat L. Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor- und Frühgeschichtlichen Moorleichen. *Z Für Parasitenkd.* 1º de outubro de 1944;13(3):265.

9. Pizzi T, Schenone H. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Bol Chil Parasitol.* 1954;9:73–5.
10. Araújo AJ, Ferreira LF, Confalonieri UE, Nuñez L, Ribeiro Filho BM. The finding of *Enterobius vermicularis* eggs in pre-Columbian human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Junho de 1985;80(2):141–3.
11. Cockburn TA. Infectious diseases in ancient populations. *Curr Anthropol.* 1971;12:45–62.
12. Ferreira LF, Araujo A, Reinhard KJ. *Fundamentos da Paleoparasitologia.* 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2011. 484 p.
13. Coura JR. *Dinâmica Das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* 2º ed. Vol. 1. Brasil: Guanabara Koogan; 2013. 2080 p.
14. Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U, Chame M. Hookworms and the peopling of America. *Cad Saúde Pública.* Junho de 1988;4(2):226–33.
15. Bush A, Fernández J, Esch G, Seed J. *Parasitism: The Diversity and Ecology of Animal Parasites.* Reino Unido: Cambridge University Press; 2011. 566 p.
16. Weaver HJ, Hawdon JM, Hoberg EP. Soil-transmitted helminthiases: implications of climate change and human behavior. *Trends Parasitol.* Dezembro de 2010;26(12):574–81.
17. Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol.* Novembro de 2000;30(12–13):1379–93.
18. Stiner M, Kuhn S. Paleolithic Diet and the Division of Labor in Mediterranean Eurasia. In: *The Evolution of Hominin Diets: Integrating Approaches to the Study of Palaeolithic Subsistence.* Alemanha: Springer Science + Business Media; 2009. p. 157–169.
19. Richards M. Stable Isotope Evidence for European Upper Paleolithic Human Diets. In: *The Evolution of Hominin Diets: Integrating Approaches to the Study of Palaeolithic Subsistence.* Alemanha: Springer Science + Business Media; 2009. p. 251–257.
20. Konner M, Eaton SB. Paleolithic nutrition: twenty-five years later. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* Dezembro de 2010;25(6):594–602.
21. Eaton SB, Cordain L. Evolutionary aspects of diet: old genes, new fuels. Nutritional changes since agriculture. *World Rev Nutr Diet.* 1997;81:26–37.
22. Mazoyer M, Roudart L. *História das agriculturas do mundo: do neolítico à crise contemporânea.* São Paulo: Fundação Editora ds UNESP; 2010. 568 p.
23. Barrett R, Kuzawa CW, McDade T, Armelagos GJ. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: The Third Epidemiologic Transition. *Annu Rev Anthropol.* 1998;27(1):247–71.
24. Omran AR. The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. *Milbank Q.* 1971;4(49):509–38.

25. Reinhard KJ, Ferreira LF, Bouchet F, Sianto L, Dutra JMF, Iniguez A, et al. Food, parasites, and epidemiological transitions: A broad perspective. *Int J Paleopathol.* 1º de setembro de 2013;3(3):150–7.
26. Ujvari SC. A história da disseminação dos microrganismos. *Estud Av.* Dezembro de 2008;22(64):171–82.
27. Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF. Paleoparasitology in Brazil. *Ciênc Amp Saúde Coletiva.* 2002;7(1):191–6.
28. Cockburn A. Where did our infectious diseases come from? The evolution of infectious disease. *Ciba Found Symp.* 1977;(49):103–12.
29. Allison MJ, Pezzia A, Hasegawa I, Gerszten E. A case of hookworm infestation in a Precolumbian American. *Am J Phys Anthropol.* Julho de 1974;41(1):103–6.
30. Jaeger LH, Iñiguez AM. Molecular paleoparasitological hybridization approach as effective tool for diagnosing human intestinal parasites from scarce archaeological remains. *PloS One.* 2014;9(8):e105910.
31. Iñiguez AM, Reinhard K, Carvalho Gonçalves ML, Ferreira LF, Araújo A, Paulo Vicente AC. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J Parasitol.* Novembro de 2006;36(13):1419–25.
32. Jaeger LH, Gijón-Botella H, Del Carmen Del Arco-Aguilar M, Martín-Oval M, Rodríguez-Maffiotte C, Del Arco-Aguilar M, et al. Evidence of Helminth Infection in Guanche Mummies: Integrating Paleoparasitological and Paleogenetic Investigations. *J Parasitol.* Abril de 2016;102(2):222–8.
33. Brown TA, Brown KA. Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* Outubro de 1994;16(10):719–26.
34. Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature.* Novembro de 1984;312(5991):282.
35. Pääbo S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature.* Abril de 1985;314(6012):644.
36. Araújo A, Reinhard K, Bastos OM, Costa LC, Pirmez C, Iñiguez A, et al. Paleoparasitology: Perspectives With New Techniques. *Rev Inst Med Trop. São Paulo.* Novembro de 1998.
37. Iñiguez AM. Paleoparasitologia Molecular e Paleogenética para o Estudo das Doenças Infecto-Parasitárias do Passado: Princípios, Metodologia e Agravos. In: *Avances Recientes de La Bioarqueología Latino América.* Buenos Aires: Grupo de Investigación en Bioarqueología; 2014. p. 286–312.
38. Pruvost M, Schwarz R, Correia VB, Champlot S, Braguier S, Morel N, et al. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 16 de janeiro de 2007;104(3):739–44.

39. Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 29 de outubro de 2005;360(1462):1805–11.
40. Wood JR. DNA barcoding of ancient parasites. *Parasitology.* Abril de 2018;145(5):646–55.
41. Loreille O, Roumat E, Verneau O, Bouchet F, Hänni C. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int J Parasitol.* Agosto de 2001;31(10):1101–6.
42. Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south American human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Janeiro de 2003;98:67–9.
43. Boast AP, Weyrich LS, Wood JR, Metcalf JL, Knight R, Cooper A. Coprolites reveal ecological interactions lost with the extinction of New Zealand birds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(7):1546–51.
44. Ferreira LF. O fenômeno parasitismo. *Rev Soc Bras Med Trop.* Agosto de 1973;7(4):261–77.
45. Hugot J-P, Gardner SL, Borba V, Araujo P, Leles D, Stock Da-Rosa AA, et al. Discovery of a 240 million year old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates. *Parasit Vectors.* 13 de novembro de 2014;7(1):486.
46. Moreno-Mayar JV, Rasmussen S, Seguin-Orlando A, Rasmussen M, Liang M, Flåm ST, et al. Genome-wide ancestry patterns in Rapanui suggest pre-European admixture with Native Americans. *Curr Biol CB.* 3 de novembro de 2014;24(21):2518–25.
47. Malaspina A-S, Lao O, Schroeder H, Rasmussen M, Raghavan M, Moltke I, et al. Two ancient human genomes reveal Polynesian ancestry among the indigenous Botocudos of Brazil. *Curr Biol CB.* 3 de novembro de 2014;24(21):R1035–7.
48. Sene G. Indicadores de gênero na pré-história brasileira: contexto funerário, simbolismo e diferenciação social - O sítio arqueológico Gruta do Gentio II, Unaí, Minas Gerais [Tese de Doutorado]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2007.
49. Costa B. Resíduos Líticos da Gruta do Gentio II, UNAÍ-MG [Dissertação de Mestrado]. [Rio de Janeiro]: Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2009.
50. Dias OF, Carvalho E. Aspectos da Arqueologia Amazônica A participação do Instituto de Arqueologia Brasileira no Programa Nacional de Pesquisas Arqueológicas na Bacia Amazônica –Pronapaba–1977-1980. *Bol Inst Arqueol Bras.* 1982;20.

51. Costa B. Ocorrência e variabilidade dos tipos litológicos nos resíduos de lascamento da Gruta do Gentio II, Unai-MG [Especialização]. [Rio de Janeiro]: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2007.
52. Sene G. Rituais Funerários e Processos Culturais : Os Caçadores-coletores e horticultores Pré-Históricos do Noroeste de Minas Gerais. 1999.
53. Sene G, Seda PRG. Teoria Arqueológica, Gênero e Diferenciação Social na Pré-História Brasileira: A Tradição Una - 3. A Tradição Una [Internet]. IBPA. 2012 [citado 8 de março de 2019]. Disponível em: http://ibparj.blogspot.com/2012/04/teoria-arqueologica-genero-e_8973.html
54. Seda PRG, Machado CL, Sene GM, Silva L da PR da. Do cerrado ao mar: a Tradição Una no litoral do Espírito Santo. Rev Maracanan. 31 de dezembro de 2011;7(7):55–82.
55. Cheuiche L. Biologia de Grupos Indígenas Pré-históricos do Sudeste Brasil. As Tradições Una e Itaipu. In: Prehistoria Sudamericana Nuevas Perspectivas. Washington: Taraxacum; 1992. p. 77–103.
56. Dias OF, Rodriguez C, Coirola A, Vieira M, Carrasco R. Boletim nº8. Bol Inst Arqueol Bras. 1979;40.
57. Jouy-Avantin F, Debenath A, Moigne A-M, Moné H. A Standardized Method for the Description and the Study of Coprolites. J Archaeol Sci. 1º de março de 2003;30(3):367–72.
58. Chame M. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. Mem Inst Oswaldo Cruz. Janeiro de 2003;98:71–94.
59. Munsell C. Munsell Soil Color Chart. Estados Unidos: Baltimore; 1975. 4 p.
60. Callen EO, Cameron TW. A prehistoric diet as revealed in coprolites. New Sci. 1960;(8):35–40.
61. Lutz A. Schistosomum Mansoni and Schistosomiasis observed in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1919;11(1):121–55.
62. Roberts L, Janovy Jr. J, Nadler S. Foundations of Parasitology. 9º ed. Estados Unidos: McGraw-Hill Education; 2012. 688 p.
63. Kitano T, Umetsu K, Tian W, Osawa M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. Int J Legal Med. Setembro de 2007;121(5):423–7.
64. Moravec F. Proposal of a new systematic arrangement of nematodes of the family Capillariidae. Folia Parasitol (Praha). 1982;29(2):119–32.
65. Mueller JF. A Diphyllbothrium from Cats and Dogs in the Syracuse Region. J Parasitol. 1935;21(2):114–21.
66. Huffman JE, Fried B. Echinostoma and Echinostomiasis. In: Baker JR, Muller R, organizadores. Advances in Parasitology. Academic Press; 1990.

67. Lie KJ, Basch PF. The Life History of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *J Parasitol.* 1967;53(6):1192–9.
68. Hall JE, Sonnenberg B. An apparent case of human infection with the whipworm of dogs, *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789). *J Parasitol.* abril de 1956;42(2):197–9.
69. Maldonado A, Vieira GO, Lanfredi RM. *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *J Parasitol.* agosto de 2003;89(4):800–8.
70. Lorente FL, Meyer KEB, Horn AH. Análise Palinológica da Vereda da Fazenda Urbano, Município de Buritizeiro, Minas Gerais, Brasil. *Rev Geonomos* 2010;18(2).
71. Hollocher K, Hollocher T. Early process in the fossilization of terrestrial feces to coprolites, and microstructure preservation. In: *Vestebates Coprolites.* Estados Unidos: New Mexico Museum of Natural History & Science; 2012. p. 79–82.
72. Boer CA, Assis RL de, Silva GP, Braz AJBP, Barroso AL de L, Cargnelutti Filho A, et al. Ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura na entressafra em um solo de cerrado. *Pesqui Agropecuária Bras.* Setembro de 2007;42(9):1269–76.
73. Seilacher A., Reif W.-e., Westphal F., Riding R., Clarkson E. N. K., Whittington Harry Blackmore, et al. Sedimentological, ecological and temporal patterns of fossil Lagerstätten. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 17 de outubro de 1985;311(1148):5–24.
74. Seilacher A, Marshall C, Skinner HCW, Tsuihiji T. A fresh look at sideritic “coprolites”. *Paleobiology.* ed de 2001;27(1):7–13.
75. Stringer Chris. The origin and evolution of *Homo sapiens*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 5 de julho de 2016;371(1698):20150237.
76. Bednarik RG. Interpreting Evidence for Art Origin. *Archaeol Ethnol Anthropol Eurasia.* 2004;31–43.
77. Correia da Costa C, Lima J, Cardoso L, Heriques V. *Fauna do Cerrado.* Rio de Janeiro: IBGE; 1981. 225 p. (Recursos Naturais e Meio Ambiente).
78. Simms MJ. Emplacement and preservation of vertebrates in caves and fissures. *Zool J Linn Soc.* 1º de setembro de 1994;112(1):261–83.
79. Bergqvist LP, Almeida EB. Biodiversidade de Mamíferos Fósseis Brasileiros. *Rev Geociências - UNG-Ser.* 26 de setembro de 2013;9(6):54–68.
80. Vasconcelos AG, Meyer KEB, Campello MS. Mamíferos Quaternários da Caverna ES-08, Município de Prudente de Moraes, Minas Gerais: Análises Tafonômica e Taxonômica. *Rev Bras Paleontol.* 21 de agosto de 2017;18(1):171–90.
81. Mayer E. Processos de formação de um depósitoossilífero em abismo na gruta Cuvieri (MG): taxonomia, tafonomia e distribuição espacial de fósseis de mamíferos do Pleistoceno [Dissertação de Mestrado]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2011.

82. Hubbe A. New Late-Pleistocene Dates for the Extinct Megafauna of Lagoa Santa , Brazil. 2009.
83. Chame M, Araujo A, Confalonieri U. Ex-perimental paleoparasitology: an approach to the diagnosis of animal coprolites. *Paleopathol Newsl.* 1991;(76):7–9.
84. Fugassa M, Guichón R. ANÁLISIS PALEOPARASITOLÓGICO DE COPROLITOS HALLADOS EN SITIOS ARQUEOLÓGICOS DE PATAGONIA AUSTRAL: DEFINICIONES Y PERSPECTIVAS. *Magallania Punta Arenas.* Novembro de 2005;33(2):13–9.
85. Souza MV, da Silva LGR, Silva-Pinto V, Mendez-Quiros P, de Miranda Chaves SA, Iñiguez AM. New paleoparasitological investigations from the pre-inca to hispanic contact period in northern Chile. *Acta Trop.* Fevereiro de 2018;178:290–6.
86. Beltrame MO, Tietze E, Pérez AE, Bellusci A, Sardella NH. Ancient parasites from endemic deer from “CUEVA PARQUE DIANA” archeological site, Patagonia, Argentina. *Parasitol Res.* Maio de 2017;116(5):1523–31.
87. Tolar T, Galik A. A Study of Dog Coprolite from Late Neolithic Pile-Dwelling Site in Slovenia. *Archaeol Discov.* 14 de janeiro de 2019;07:20.
88. Galetti M. Parques do Pleistoceno: recriando o cerrado e o pantanal com a megafauna. *Natureza&Conservação.* 2004;2(1):18–24.
89. Antunes G. Diversidade e Potencial Zoonótico de Parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia: Didelphidae) [Tese de Doutorado]. [Rio Grande do Sul]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
90. Teodoro AK. Estudo dos parasitos intestinais e sanguíneos de *Didelphis* spp. capturados em área urbana e em fragmentos de mata ciliar associados à Bacia do Rio Capivari no município de Monte Mor, São Paulo, Brasil [Dissertação de Mestrado]. [São Paulo]: Universidade Estadual de Campinas; 2013.
91. Zabott MV, Pinto SB, Viott A de M, Gruchouskei L, Bittencourt LHF de B. Helminthofauna de *Didelphis albiventris* (LUND, 1841) no Município de Palotina, Paraná, Brasil. *Arq Ciênc Veterinárias E Zool UNIPAR.* 30 de agosto de 2017.
92. Dib LV, Cronemberger C, Pereira F de A, Bolais PF, Uchôa CMA, Bastos OMP, et al. Gastrointestinal parasites among felids inhabiting the Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet Braz J Vet Parasitol Orgao Of Col Bras Parasitol Vet.* Junho de 2018;27(2):131–40.
93. Quadros RM de, Weiss PHE, Milette LC, Moura AB de, Quadros RM de, Weiss PHE, et al. Occurrence of *Calodium hepaticum* (BANCROFT, 1893) Moravec, 1982 Eggs in Feces Of Dogs and Cats in Lages, Santa Catarina, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2016.
94. Nakamura N. Parasitic lesions of bovine liver attributed to capillaria species. *J Comp Pathol.* Abril de 2005;132(2–3):228–31.
95. Tessaro SV. Review of the diseases, parasites and miscellaneous pathological conditions of North American bison. *Can Vet J.* Maio de 1989;30(5):416–22.

96. Santos TR dos, Lopes WDZ, Buzulini C, Borges F de A, Sakamoto CAM, Lima RC de A, et al. Helminth fauna of bovines from the Central-Western region, Minas Gerais State, Brazil. *Ciênc Rural*. Abril de 2010;40(4):934–8.
97. Da silva M, Boaventura V, Fioravanti M. História do Povoamento Bovino no Brasil Central. *Rev UFG*. 2012;13(8):34–41.
98. Ferreira LF, de Araújo AJ, Confalonieri UE. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980;74(6):798–800.
99. Ferreira LF, de Araújo AJ, Confalonieri UE. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77(1):65–7.
100. Almeida GG, Coscarelli D, Melo MN, Melo AL, Pinto HA. Molecular identification of *Spirometra* spp. (Cestoda: Diphylobothriidae) in some wild animals from Brazil. *Parasitol Int*. 1º de outubro de 2016;65(5, Part A):428–31.
101. Gressler LT, Noll JCG, Freitas ÍB de, Monteiro SG, Gressler LT, Noll JCG, et al. Multiparasitism in a wild cat (*Leopardus colocolo*) (Carnivora: Felidae) in southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. Setembro de 2016;25(3):374–7.
102. Araújo A, Ferreira LF. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95:89–93.
103. Reinhard K, Confalonieri U, Herrmann B, Ferreira L, Araujo A. Recovery of Parasite Remains From Coprolites and Latrines: Aspects of Paleoparasitological Technique. *Anthropol Fac Publ*. 1º de janeiro de 1986.
104. Ferreira LF, Araújo AJG de, Confalonieri UEC, Nuñez L, Ferreira LF, Araújo AJG de, et al. The finding of eggs of *Diphylobothrium* in human coprolites (4.100-1.950 BC) from Northern Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Junho de 1984;79(2):175–80.
105. Souza RP, Souza JN, Menezes JF, Alcântara LM, Soares NM, Aquino Teixeira MC. Human infection by *Trichostrongylus* spp. in residents of urban areas of Salvador city, Bahia, Brazil. *Biomed Rev Inst Nac Salud*. Setembro de 2013;33(3):439–45.
106. O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet Parasitol*. 30 de novembro de 2006;142(1–2):1–15.
107. Bhinsara DB, Sankar M, Sudan V, Thakre BJ, Kumar R, Kumar A, et al. Molecular Characterization of β -Tubulin Isotype-1 Gene of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2018;3(7):346–54.
108. Holmes PH. Pathogenesis of trichostrongylosis. *Vet Parasitol*. 1º de agosto de 1985;18(2):89–101.
109. Guedes L, Dias O, Neto J, Ribeiro da Silva L da P, Mendonça de Souza SMF, Iñiguez AM. First Paleogenetic Evidence of Probable Syphilis and Treponematoses Cases in the Brazilian Colonial Period. *BioMed Res Int*. 2018;8.

110. Gholami S, Babamahmoodi F, Abedian R, Sharif M, Shahbazi A, Pagheh A, et al. *Trichostrongylus colubriformis*: Possible Most Common Cause of Human Infection in Mazandaran Province, North of Iran. *Iran J Parasitol*. Março de 2015;10(1):110–5.
111. Phosuk I, Intapan PM, Sanpool O, Janwan P, Thanchomnang T, Sawanyawisuth K, et al. Molecular Evidence of *Trichostrongylus colubriformis* and *Trichostrongylus axei* Infections in Humans from Thailand and Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg*. 7 de agosto de 2013;89(2):376–9.
112. Sato M, Yoonuan T, Sanguankiat S, Nuamtanong S, Pongvongsa T, Phimmayoi I, et al. Short report: Human *Trichostrongylus colubriformis* infection in a rural village in Laos. *Am J Trop Med Hyg*. Janeiro de 2011;84(1):52–4.
113. Machado ER, De Souza TS, Da Costa JM, Costa-Cruz JM. Enteroparasites and commensals among individuals living in rural and urban areas in Abadia dos Dourados, Minas Gerais state, Brazil. *Parasitol Latinoam*. Dezembro de 2008;63(1-2-3-4):34–9.
114. Sianto L, de Miranda Chaves SA, Teixeira-Santos I, Pereira PA, Godinho RM, Gonçalves D, et al. Evidence of contact between New and Old World: paleoparasitological and food remains study in the Tagus river population of Sarilhos Grandes (Montijo, Portugal). *Archaeol Anthropol Sci*. 1º de fevereiro de 2018;10(1):75–81.
115. Seo M, Araujo A, Reinhard K, Chai JY, Shin DH. Paleoparasitological Studies on Mummies of the Joseon Dynasty, Korea. *Korean J Parasitol*. Junho de 2014;52(3):235–42.
116. Reinhard KJ, Ambler JR, McGuffie M. Diet and Parasitism at Dust Devil Cave. *Am Antiq*. Outubro de 1985;50(4):819–24.
117. Fugassa MH, Beltrame MO, Sardella NH, Civalero MT, Aschero C. Paleoparasitological results from coprolites dated at the Pleistocene–Holocene transition as source of paleoecological evidence in Patagonia. *J Archaeol Sci*. 1º de Abril de 2010;37(4):880–4.
118. Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Janeiro de 2003;98:103–18.
119. Araújo A, Confalonieri U, Ferreira LF. Encontro de ovos de *Trichostrongylidae* e *trichuris trichiura* em corpo mumificados do período colonial brasileiro. *Cent Ciênc Biológicas E Saúde*. 1984.
120. Rojas N, Arias M, Arece J, Carrión M, Pérez K, Valerino P. IDENTIFICACIÓN DE *Trichostrongylus colubriformis* Y *Oesophagostomum columbianum* EN CAPRINOS DEL VALLE DEL CAUTO EN GRANMA. *Rev Salud Anim*. Agosto de 2011;33(2):118–20.
121. Spratt DM. Description of capillariid nematodes (Trichinelloidea:Capillariidae) parasitic in Australian marsupials and rodents. Auckland, N.Z.: Magnolia Press; 2006.

122. Moravec F, Prokopic J, Shlikas AV. The biology of nematodes of the family Capillariidae Neveu-Lemaire, 1936. *Folia Parasitol (Praha)*. 1987;34(1):39–56.
123. Rocha E. Título da Dissertação: Estudo da prevalência da *Capillaria hepatica* (syn. *Calodium hepaticum*) em humanos e roedores em uma área urbana de Porto Velho, Rondônia, Brasil [Dissertação de Mestrado]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2014.
124. Moskvina TV, Schelkanov MY, Begun MA. Endoparasites of the Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Integr Zool*. 1º de Setembro de 2018;13(5):507–16.
125. Demirer aylin, AKKOÇ A, Senlik B, Cangul T. Severe granulomatous hepatitis caused by *Capillaria hepatica* in a puppy. *Turk J Vet Anim Sci*. 2018;(42):496–9.
126. Soares M, Nunes H, Silveira F, Alves M, Souza A. *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) (Nematoda) entre populações indígenas e mamíferos silvestres no noroeste do Estado do Mato Grosso, Brasil, 2000. *Rev Pan-Amaz Saude*. 35-40;3(2):35–40.
127. Fuehrer H-P. An overview of the host spectrum and distribution of *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*): part 2—Mammalia (excluding Muroidea). *Parasitol Res*. 2014;113(2):641–51.
128. Fuehrer H-P. An overview of the host spectrum and distribution of *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*): part 1—Muroidea. *Parasitol Res*. 2014;113(2):619–40.
129. Klisiowicz D do R, Reifur L, Shimada MK, Haidamak J, Cognialli RCR, Ferreira T, et al. High occurrence of *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*) spurious infection in a village in the Atlantic Forest of southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Maio de 2014;109(3):371–3.
130. Carvalho-Costa FA, Silva AG, de Souza AH, Moreira CJ de C, de Souza DL, Valverde JG, et al. Pseudoparasitism by *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*; *Hepaticola hepatica*) in the Negro River, Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Outubro de 2009;103(10):1071–3.
131. Gonçalves AQ, Ascaso C, Santos I, Serra PT, Julião GR, Orlandi PP. *Calodium hepaticum*: household clustering transmission and the finding of a source of human spurious infection in a community of the Amazon region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1943.
132. Moreira VLC, Giese EG, Silva DCB da, Melo FT de V, Furtado AP, Maldonado Jr A, et al. *Calodium hepaticum* (Nematoda: Capillariidae) in synanthropic rodents (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) in Eastern Amazonia. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. Junho de 2013;22(2):265–9.
133. Simões RO, Luque JL, Faro MJ, Motta E, Maldonado JR. A, Simões RO, et al. Prevalence of *Calodium hepaticum* (SYN. *Capillaria hepatica*) in *Rattus norvegicus* in the Urban Area of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. Setembro de 2014;56(5):455–7.

134. Pinheiro RH da S, Chaves IBP, Rodrigues RAR, Branco É, Lima AR de, Giese EG. Nematode capilaridae in the tongue of *Cercopithecus thous* of free life in Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. Dezembro de 2018;27(4):531–44.
135. Quadros RM, Pilati C, Marques SMT, Mazzolli M, Benedet RC. *Capillaria hepatica* in *Puma concolor*: first report in Brazil. *J Zoo Wildl Med Off Publ Am Assoc Zoo Vet*. Setembro de 2009;40(3):586–7.
136. Quintão e Silva M da G, Costa HM. Helminths of white-bellied opossum from Brazil. *J Wildl Dis*. Abril de 1999;35(2):371–4.
137. Bonfim D. Interação Parasita-Hospedeiro em Pequenos Mamíferos Não-Voadores em Mata de Galeria no Brasil Central [Dissertação de Mestrado]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2013.
138. Teixeira PEF, Corrêa CL, Oliveira FB de, Alencar ACM de B, Neves LB das, Garcia DD, et al. Occurrence of *Capillaria* sp. in the liver of sheep (*Ovis aries*) in a slaughterhouse in the state of Acre, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet Braz J Vet Parasitol Orgao Of Col Bras Parasitol Vet*. Junho de 2018;27(2):226–31.
139. Ladim VJ, Costa AJ, Costa GH, Rocha UF, Barbosa OF, Moraes FR. Parasitic Nematodes in Weaned Calves From the Northeast Region of São Paulo State, Brasil. *ARS Vet*. 2011;1(17):42–50.
140. Santiago MAM, Costa UC da, Benevenga SF. Estudo comparativo da prevalência de helmintos em ovinos e bovinos criados na mesma pastagem. *Pesqui Agropecuária Bras*. 1975;10(8):51–6.
141. Gibbs HC, Herd RP. Nematodiasis in Cattle: Importance, Species Involved, Immunity, and Resistance. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1º de julho de 1986;2(2):211–24.
142. Justine JL (Museum N d’Histoire N, Ferte H. Redescription of *Capillaria bovis* (Schnyder, 1906) (Nematoda, Capillariinae). *Bull Mus Natl Hist Nat Sect Zool Biol Ecol Anim Fr*. 1988.
143. Worley DE, Barrett RE, Knapp SE. Hosts and distribution of *Capillaria bovis* (Schnyder, 1906) in domestic and wild ruminants in northwestern United States. *J Parasitol*. Agosto de 1980;66(4):695–6.
144. Wakelin D. Nematodes of the genus *Capillaria* Zeder, 1800 from the collection of the London School of Hygiene and Tropical Medicine. 3. Capillariids from mammalian hosts. *J Helminthol*. 1968;42(3):383–94.
145. Kruger JM, Osborne CA. The role of uropathogens in feline lower urinary tract disease. Clinical implications. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Janeiro de 1993;23(1):101–23.
146. Ventura-Morales A, Zaragova-Vera C, Santamria-Ricardo E, Garcia-Herrera R. *Capillaria plica* infection in a cat. *J Anim Vet Adv*. 2012;21(11):3943–5.
147. Traversa D, Di Cesare A. Feline lungworms: what a dilemma. *Trends Parasitol*. Setembro de 2013;29(9):423–30.

148. Collins GH. A limited survey of gastro-intestinal helminths of dogs and cats. *N Z Vet J.* Agosto de 1973;21(8):175–6.
149. Hodžić A, Bruckschwaiger P, Duscher GG, Glawischnig W, Fuehrer H-P. High prevalence of *Eucoleus boehmi* (syn. *Capillaria boehmi*) in foxes from western Austria. *Parasitol Res.* Agosto de 2016;115(8):3275–8.
150. Bouchet F. Intestinal capillariasis in neolithic inhabitants of Chalain (Jura, France). *Lancet Lond Engl.* 25 de Janeiro de 1997;349(9047):256.
151. Bouchet F, Harter S, Le Bailly M. The state of the art of paleoparasitological research in the old world. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* janeiro de 2003;98:95–101.
152. Makki M, Dupouy-Camet J, Sajjadi SMS, Naddaf SR, Mobedi I, Rezaeian M, et al. First Paleoparasitological Report on the Animal Feces of Bronze Age Excavated from Shahr-e Sukhteh, Iran. *Korean J Parasitol.* Abril de 2017;55(2):197–201.
153. Fugassa MH. Camélidos, parásitos y ocupaciones humanas: registros paleoparasitológicos en Cerro Casa de Piedra 7 (Parque Nacional Perito Moreno, Santa Cruz, Argentina). *Intersecc En Antropol.* Dezembro de 2007;(8):265–9.
154. Fugassa MH, Denegri GM, Sardella NH, Araújo A, Guichón RA, Martínez PA, et al. Paleoparasitological records in a canid coprolite from Patagonia, Argentina. *J Parasitol.* Outubro de 2006;92(5):1110–3.
155. Fugassa MH, Beltrame MO, Bayer MS, Sardella NH. Zoonotic parasites associated with felines from the Patagonian Holocene. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Dezembro de 2009;104(8):1177–80.
156. Beltrame MO, De Porrás ME, Barberena R, Llano CL, Sardella NH. First study of fossil rodent middens as source of paleoparasitological evidences (northwestern Patagonia, Argentina). *Parasitol Int.* 1º de agosto de 2016;65(4):352–6.
157. Bailly ML, Goepfert N, Prieto G, Verano J, Dufour B. Camelid Gastrointestinal Parasites from the Archaeological Site of Huanchaquito (Peru): First Results. *Environ Archaeol.* 7 de janeiro de 2019;0(0):1–8.
158. Sianto L, de Souza MV, Chame M, da Luz M de F, Guidon N, Pessis A-M, et al. Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the Brazilian Northeast. *Parasitol Int.* Dezembro de 2014;63(6):851–7.
159. Meyer MC. Cestode zoonoses of aquatic animals. *J Wildl Dis.* Outubro de 1970;6(4):249–54.
160. Scioscia NP, Petrigh RS, Beldomenico PM, Denegri GM. The Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) as new definitive host for *Spirometra erinacei* (Cestoda: Diphyllbothriidae). *Acta Trop.* Maio de 2014;133:78–82.
161. Wiwanitkit V. A review of human sparganosis in Thailand. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* Novembro de 2005;9(6):312–6.

162. Cho SY, Bae JH, Seo BS. Some Aspects Of Human Sparganosis In Korea. *Kisaengchunghak Chapchi*. Junho de 1975;13(1):60–77.
163. Mentz MB, Procianoy F, Maestri MK, Rott MB. Human ocular sparganosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. Fevereiro de 2011;53(1):51–3.
164. Wang P, Su X, Mao Q, Liu Y. The surgical removal of a live tapeworm with an interesting pathologic finding most likely representing the migration path: a case report of cerebral sparganosis. *Clin Sao Paulo Braz*. Julho de 2012;67(7):849–51.
165. Headley SA, Gillen MA, Sanches AWD, Satti MZ. *Platynosomum fastosum*-induced chronic intrahepatic cholangitis and *Spirometra* spp. infections in feral cats from Grand Cayman. *J Helminthol*. Junho de 2012;86(2):209–14.
166. Müller-Graf CD, Woolhouse ME, Packer C. Epidemiology of an intestinal parasite (*Spirometra* spp.) in two populations of African lions (*Panthera leo*). *Parasitology*. Abril de 1999;118 (Pt 4):407–15.
167. Huh S, Sohn WM, Chai JY. Intestinal parasites of cats purchased in Seoul. *Korean J Parasitol*. Dezembro de 1993;31(4):371–3.
168. Vieira FM, Luque JL, Muniz-Pereira LC. Checklist of helminth parasites in wild carnivore mammals from Brazil. *Zootaxa*. 7 de março de 2008;1721(1):1–23.
169. Sianto L, Duarte AN, Borba VH, Magalhães JG, de Souza SM, Chame M. Echinostomes in Felid Coprolites from Brazil. *J Parasitol*. 2016;102(3):385–7.
170. Sianto L. PARASITISMO POR ECHINOSTOMA SP. (TREMATODA: DIGENEA: ECHINOSTOMATIDAE) EM POPULAÇÕES PRÉ-COLOMBIANAS: UM ESTUDO DE CASO [Dissertação de Mestrado]. [Rio de Janeiro]: Fundação Oswaldo Cruz; 2004.
171. Ferreira LF, Reinhard KJ, Araujo A. *Paleoparasitologia*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008. 128 p.
172. Hotez P. Hookworm and poverty. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1136:38–44.
173. Mohanty A, Gupta P, Gupta P, Prasad R. Diagnostic Dilemma in Hookworm Infection: An Unusual Presentation. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2018;3(7):3769–71.
174. Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SMM de, Ferreira LF, Vicente ACP, et al. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Agosto de 2008;103(5):514–6.
175. Heizer RF, Napton LK. Biological and cultural evidence from prehistoric human coprolites. *Science*. 8 de Agosto de 1969;165(3893):563–8.
176. Chin K. Analyses of Coprolites Produced by Carnivorous Vertebrates. *Paleontol Soc Pap*. Outubro de 2002;8:43–50.

177. de Oliveira FA, Santucci RM. Criteria for recognition and taphonomy of coprolites from the Serra da Galga Member, Marília Formation (Upper Cretaceous), Minas Gerais, Brazil. *J South Am Earth Sci.* 1º de outubro de 2017;78:1–16.
178. Hunt A, Spencer L. Crocodylian Coprolites and the Identification of the Producers of Coprolites. *Crocodyle Tracks Traces.* 2010;(51):219–26.
179. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, de Lima JM. *Trichuris trichiura* eggs in human coprolites from the archaeological site of “Furna do Estrago”, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Dezembro de 1989;84(4):581.
180. Beltrame MO, Bellusci A, Fernández FJ, Sardella NH. Carnivores as zoonotic parasite reservoirs in ancient times: the case of the Epullán Chica archaeological cave (Late Holocene, northwestern Patagonia, Argentina). *Archaeol Anthropol Sci.* 1º de junho de 2018;10(4):795–804.
181. Dentzien-Dias P, Carrillo-Briceño JD, Francischini H, Sánchez R. Paleoeological and taphonomical aspects of the Late Miocene vertebrate coprolites (Urumaco Formation) of Venezuela. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 15 de janeiro de 2018;490:590–603.
182. Sirak KA, Fernandes DM, Cheronet O, Novak M, Gamarra B, Balassa T, et al. A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *Bio Techniques.* 01 de 2017;62(6):283–9.
183. Bálint M, Pfenninger M, Grossart H-P, Taberlet P, Vellend M, Leibold MA, et al. Environmental DNA Time Series in Ecology. *Trends Ecol Evol.* Dezembro de 2018;33(12):945–57.
184. Karpinski E, Mead JI, Poinar HN. Molecular identification of paleofeces from Bechan Cave, southeastern Utah, USA. *Quat Int.* 2 de julho de 2017;443:140–6.
185. Poinar H, Kuch M, McDonald G, Martin P, Pääbo S. Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol CB.* 1º de julho de 2003;13(13):1150–2.
186. Bon Céline, Berthonaud Véronique, Maksud Frédéric, Labadie Karine, Poulain Julie, Artiguenave François, et al. Coprolites as a source of information on the genome and diet of the cave hyena. *Proc R Soc B Biol Sci.* 22 de julho de 2012;279(1739):2825–30.
187. Hunt A, Spencer L, Millàn J, Spielmann J. Vertebrate Coprolite Studies: Status and Prospectus. *Vertabrate Coprolites.* 2012;(57):5–24.
188. Petrigh RS, Fugassa MH. Improved coprolite identification in Patagonian archaeological contexts. *Quat Int.* 18 de maio de 2017;438:90–3.
189. Fugassa MH, Petrigh RS, Fernández PM, Carballido Catalayud M, Belleli C. Fox parasites in pre-Columbian times: Evidence from the past to understand the current helminth assemblages. *Acta Trop.* Setembro de 2018;185:380–4.

190. Lima VS, Iniguez AM, Otsuki K, Ferreira LF, Araújo A, Vicente ACP, et al. Chagas Disease in Ancient Hunter-Gatherer Population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. Junho de 2008;14(6):1001–2.
191. Jaeger LH, Leles D, Lima V dos S, da Silva L da P, Dias O, Iñiguez AM. Mycobacterium tuberculosis complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. Junho de 2012;12(4):642–8.
192. Iñiguez AM, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Janeiro de 2003;98:63–5.
193. Jaeger LH, de Souza SMFM, Dias OF, Iñiguez AM. Mycobacterium tuberculosis Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil. *Emerg Infect Dis*. Maio de 2013;19(5):837–8.
194. Brito LS. Estudo paleogenético das treponematoses e infecções concomitantes em populações pré-colombianas do Brasil [Monografia]. [Rio de Janeiro]: Universidade Estadual do Rio de Janeiro; 2019.

