

Universidade do Minho
Escola de Ciências

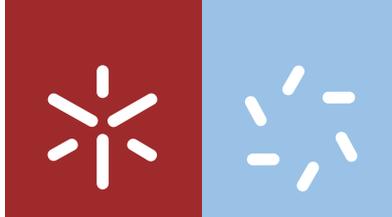
Alfredo Filipe Ferreira Araújo

**Análise de fragmentos arqueológicos:
um diálogo entre a Química, Biologia
e Arqueologia**

Alfredo Filipe Ferreira Araújo **Análise de fragmentos arqueológicos: um diálogo entre a Química, Biologia e Arqueologia**

UMinho | 2015

outubro de 2015



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Alfredo Filipe Ferreira Araújo

**Análise de fragmentos arqueológicos:
um diálogo entre a Química, Biologia
e Arqueologia**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação do
Doutor César João dos Santos Oliveira
e da
Doutora Mónica Landi

outubro de 2015

Declaração

Nome: Alfredo Filipe Ferreira Araújo

Endereço eletrónico: fffilipe@live.com.pt

Cartão de Cidadão N.º: 13546949 0 ZZ5

Título da dissertação: Análise de fragmentos arqueológicos: um diálogo entre a Química, Biologia e Arqueologia

Orientadores: Doutor César João dos Santos Oliveira
Doutora Mónica Landi

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 29 de outubro de 2015

Assinatura: _____

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Doutor César Oliveira por todos os ensinamentos, conselhos, oportunidades e principalmente pela confiança que depositou em mim nestes quase três anos de trabalho.

À Doutora Iwona Kuźniarska-Biernacka pelo auxílio prestado a este trabalho, assim como pela boa disposição que diariamente trouxe ao laboratório.

Ao Prof. Doutor Pier Parpot pela sua ajuda quando o GC-MS nos pregou partidas.

Ao Prof. Doutor Rui Morais, o *Indiana Jones* português, pelos seus ensinamentos e disponibilidade para apoiar nas dificuldades e conduzir a trabalhos adicionais.

Aos doutores Mónica Landi, minha coorientadora, e Filipe Costa por me terem introduzido na sua equipa de trabalho e me terem permitido aprender novas técnicas.

Ao Jorge Lobo pelos seus conselhos e apoio no laboratório.

À minha mãe, avós e irmão por todo o amor e oportunidades que me dão diariamente para poder perseguir os meus sonhos.

À minha namorada por todo o carinho, amor e solidariedade, mesmo quando tudo parecia estar perdido.

À Carla e Marta pelo companheirismo e excelente ambiente que proporcionaram ao longo de todo o processo.

Aos meus amigos, pela ajuda, companhia e coragem demonstrada ao me suportarem nos melhores e piores momentos.

Resumo

A ciência dedicada ao estudo de artefactos arqueológicos, arqueometria, é uma área de investigação em crescimento, revestindo-se de enorme importância para os arqueólogos os resultados por ela obtidos. De facto, a elevada porosidade de alguns materiais arqueológicos, como as cerâmicas, permite guardar no seu interior vestígios das matrizes orgânicas com as quais estiveram em contacto, possibilitando a determinação analítica do conteúdo de contentores, quer pela identificação de traçadores orgânicos moleculares, quer pela aplicação de técnicas de análise genética para a identificação de vestígios de ADN.

Neste trabalho estudaram-se trinta e cinco achados arqueológicos por técnicas analíticas distintas, com particular ênfase para a cromatografia gasosa com deteção por massa (GC-MS). Da panóplia total de amostras analisadas, trinta e duas pertenciam a contentores cerâmicos de diferentes tipologias, tendo estas sido submetidos a técnicas de preparação da amostra com vista à extração de compostos orgânicos, análise dos extratos orgânicos por GC-MS e a identificação dos traçadores moleculares, tendo-se detetado matrizes orgânicas como o mel, vinho, leite, gorduras animais e vegetais, azeite ou azeitonas e preparados piscícolas. Estudaram-se também três amostras de pigmentos naturais encontrados em dois monumentos megalíticos, tendo-se complementado a análise cromatográfica com a utilização de outras técnicas analíticas como o FTIR e XRD, que permitiram efetuar a caracterização da fração inorgânica.

Por último, aplicaram-se técnicas cromatográficas a restos orgânicos parcialmente conservados num *doliola* recuperado em Boca do Rio, Algarve, num contexto datado do final do período romano, entre os finais do séc. IV e os inícios do séc. V., tendo-se encontrado vestígios químicos da presença de peixe e derivados deste. A identificação de fragmentos de ADN antigo permitiu a utilização de técnicas de análise genética com vista à reconstituição parcial dos fragmentos de ADN degradado, tendo esta metodologia permitido a identificação de seis espécies de peixe ósseas e de uma espécie de tubarão de grande porte.

Abstract

The science devoted to the study of archaeological artifacts, archaeometry, is an area of research with an increasing interest, particularly to archaeologists that strongly benefit of their results. In fact, the high porosity of some archaeological materials as ceramics, allows to store inside their structure, traces of the original organic matrix with which they were in contact, allowing the analytical determination of the containers content, or by the identification of molecular organic traces, or by the application of genetic analysis techniques through the identification of DNA remains.

In this work, were studied thirty five archaeological artifacts by distinct analytical techniques, giving special emphasis to gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). Of the total array of samples, thirty two were ceramic containers of different typologies, being these submitted to sample preparation techniques for the extraction of organic compounds, analysis of the extracts by GC-MS and identification of the molecular traces, having detected organic matrices as honey, wine, milk, animal or vegetal fats, olives or olive oil, and fish-based products. It were also studied three samples of pigments used in two megalithic monuments, being the chromatographic analysis complemented with other analytical techniques, like FTIR and XRD, which permitted the study of the inorganic fraction.

At last, were applied chromatographic techniques to the analysis of partially conserved organic residues from a *doliola* recovered in Boca do Rio, Algarve, in a context dated from the late roman period, between the end of the IV century and the beginning of the V century. The study revealed chemical traces of fish-based products. The identification of ancient DNA molecule fragments, legitimate the utilization of genetic analysis to partially reconstitute the degraded DNA fragments, having this methodology permitted the identification of six bony fish species and a single specimen of large sized shark.

Índice Geral

Lista de siglas e abreviaturas	xiii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 - Organização da dissertação	3
1.2 - Contextualização	4
1.3 - O nascimento das primeiras civilizações	5
1.4 - A argila como material de construção	13
1.5 - As diferentes tipologias de contentores cerâmicos	15
1.5.1 – Ânforas	15
1.5.2 – <i>Dolium</i>	20
1.5.3 – Outras tipologias de contentores	21
1.6 - Mamoas e outros alvos de pinturas ancestrais	26
1.7 - Análise química e biológica de artefactos arqueológicos	27
Capítulo 2 - Arqueometria	29
2.1 - A arqueometria – etapas de um processo analítico	31
2.2 - Métodos de extração de compostos orgânicos	33
2.3 – Métodos de análise	36
2.4 – Métodos de análise elementar	40
2.5 – Aplicação do conceito de traçador molecular	42
2.5.1 – Materiais orgânicos e alguns processos de degradação	43
2.6 – Técnicas para análise de ADN antigo	58
Capítulo 3 – Procedimento experimental	65
3.1 – Instrumentação geral e reagentes: laboratórios de química analítica e de biologia molecular	67
3.1.1 – Laboratório de química analítica	67
3.1.2 – Laboratório de genética molecular	68
3.2 – Procedimentos experimentais: laboratório de química analítica	69
3.2.1 – Preparação dos materiais	69
3.2.2 – Extração da amostra	70
3.2.3 – Concentração do extrato orgânico	70
3.2.4 – Derivatização	71
3.2.5 – Parâmetros operacionais usados no equipamento cromatográfico	72
3.2.6 – Utilização de bibliotecas de espectro de massa	72
3.2.7 – Análise de cromatogramas	72
3.3 – Procedimentos experimentais: laboratório de genética molecular	73
3.3.1 – Desenho de primers	73
3.3.2 – Avaliação <i>in silico</i> da especificidade de primers (BLAST)	74
3.3.3 – Extração de ADN de tecidos biológicos modernos	75
3.3.4 – Otimização de <i>primers</i>	75
3.3.5 – Extração de ADN antigo	76

3.3.6 – Amplificação de ADN por preparação de PCR's.....	77
3.3.7 – Sequenciação.....	78
3.4 – Amostras estudadas.....	79
Capítulo 4 – Análise química de materiais arqueológicos	81
4.1 – Vasos megalíticos da idade do Bronze.....	83
4.1.1 – Pequena contextualização histórica.....	83
4.1.2 – Resultados obtidos e conclusões.....	85
4.2 – Ânforas provenientes de La Rioja, Espanha.....	89
4.2.1 – Pequena contextualização histórica.....	89
4.2.2 - Resultados obtidos e conclusões.....	91
4.3 – Ânforas provenientes das escavações de Conimbriga.....	95
4.3.1 - Pequena contextualização histórica.....	95
4.3.2 - Resultados obtidos e conclusões.....	96
4.4 – Análises a pigmentos presentes nas mamoadas de Eireira (Viana do Castelo) e Lamas (Braga).	99
4.4.1 - Pequena contextualização histórica.....	99
4.4.2 - Resultados obtidos e conclusões.....	99
4.5 – Pote meleiros e colmeias cerâmicas.....	108
4.5.1 - Pequena contextualização histórica.....	108
4.5.2 - Resultados obtidos e conclusões.....	110
4.6 – Candela romana e lucernas egípcias.....	112
4.6.1 - Pequena contextualização histórica.....	112
4.6.2 - Resultados obtidos e conclusões.....	114
4.7 – Ânforas de produção lusitanas.....	117
4.7.1 - Pequena contextualização histórica.....	117
4.7.2 - Resultados obtidos e conclusões.....	117
4.8 – Ânforas de produção de Lugo (Espanha)	120
4.8.1 - Pequena contextualização histórica.....	120
4.8.2 - Resultados obtidos e conclusões.....	121
4.9 – Preparado de peixe recuperado de um <i>doliola</i>	124
4.9.1 - Pequena contextualização histórica.....	124
4.9.2 – Resultados analíticos obtidos e conclusões.....	125
Capítulo 5 – Análise de ADN antigo	129
5.1 – Resultados biológicos obtidos e conclusões	131
Capítulo 6 - Conclusão	141
Bibliografia	145
Anexos	A
A-1 – Receita de Garum e Alec de Plínio	C
A-2 – Extrações de ADN	D
A-2.1 – Extração de ADN de tecidos biológicos modernos	D
A-2.2 – Kit de extração e purificação Roche	E

A-2.3 – Kit de extração e purificação Roche modificado	E
A-2.4 – Metodologia de extração e purificação “Foley”	E

Lista de Siglas e Abreviaturas

a.C.	antes de Cristo
AA	ácido abiético
AAS	do inglês <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i> , Espetroscopia de absorção atômica
AuES	do inglês <i>Auger Electron Spectroscopy</i> , Espetroscopia eletrônica de <i>Auger</i>
AES	do inglês <i>Atomic Emission Spectroscopy</i> , Espetroscopia de emissão atômica
Bp	do inglês <i>Base pair</i> , Pares de bases
BSTFA-TMCS	do inglês <i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane</i> , N,O-Bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida com trimetilclorosilano
CI	do inglês <i>Chemical Ionization</i> , Ionização química
COI	do inglês <i>Cytochrome Oxidase I</i> , Citocromo oxidase I
d.C.	depois de Cristo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DCM	Diclorometano
DHA	do inglês <i>Dehydroabietic Acid</i> , ácido desidroabiético
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> , ácido desoxirribonucleico
DNTP	do inglês <i>Deoxyribonucleotides Phosphatase</i> , desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> , ácido etilenodiamino tetraacético
EI	do inglês <i>Electronic Impact</i> , Impacto eletrônico
ESI	do inglês <i>Electrospray Ionization</i> , Ionização por <i>eletrospray</i>
FTIR	do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> , Espetroscopia de infravermelhos por transformada de <i>Fourier</i>
GC	do inglês <i>Gas Chromatography</i> , Cromatografia Gasosa

HPLC	do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia líquida de alta eficiência
HTS	do inglês <i>High-Throughput Sequencing</i> , Sequenciação de elevado rendimento
<i>i.e.</i>	ou seja
LC	do inglês <i>Liquid Chromatography</i> , Cromatografia líquida
LC-MS	do inglês <i>Liquid Chromatography with Mass Spectrometry</i> , cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
MALDI	do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Ionização em matriz assistida por laser de desorção
MeOH	Metanol
MS	do inglês <i>Mass Spectrometry</i> , espectrometria de massa
NGS	do inglês <i>Next Generation Sequencing</i> , sequenciação de próxima geração
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> , reação de polimerização em cadeia
PTFE	Politetrafluoretileno
RNA	do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> , Ácido ribonucleico
SDS	do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Dodecil sulfato de sódio
TOF	do inglês <i>Time Of Flight</i> , tempo de voo
UPS	do inglês <i>Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy</i> , Espectroscopia de fotoemissão de ultravioleta
XPS	do inglês <i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i> , espectroscopia fotoeletrônica de raios X
XRD	do inglês <i>X-Ray Diffraction</i> , Difração de Raios X

Capítulo 1

Introdução

1.1 Organização da dissertação

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos.

No primeiro capítulo apresentam-se os objetivos deste estudo, assim como uma pequena síntese histórica e uma breve análise tipológica aos materiais estudados. Sendo esta dissertação efetuada no âmbito do Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química, não se pretendeu a exaustiva contextualização arqueológica dos materiais estudados, tendo-se elaborado esta breve resenha para justificar perante o leitor a pertinência do trabalho efetuado. Neste sentido, aconselha-se aos leitores mais interessados na componente arqueológica deste trabalho a consulta da bibliografia apresentada.

No segundo capítulo reúne-se informação pertinente no que respeita aos próprios conceitos básicos deste trabalho, situando o leitor nas áreas científicas de maior interesse. No âmbito de um mestrado científico, são inumeradas algumas técnicas alusivas ao estudo de materiais arqueológicos, quer na área da química analítica, como na biologia molecular. É também apresentada uma síntese sobre os possíveis mecanismos de degradação de produtos comercializados na antiguidade, que levam à natural formação de traçadores moleculares, cujas deteções podem determinar (ou ajudar a determinar) conclusões coesas e decisivas sobre os estudos em questão.

No terceiro capítulo expõem-se de forma organizada, todos os procedimentos laboratoriais concretizados, com informações detalhadas sobre os vários materiais, reagentes e técnicas realizadas, tanto no sector da química analítica, como na biologia molecular. No final, é apresentada em tabela, uma síntese de todas as amostras estudadas com várias informações associadas.

No quarto e quinto capítulo, é exibida a discussão de resultados, onde ordenadamente são dispostos os vários materiais analisados, com os respetivos resultados associados e as conclusões retiradas individualmente de cada um. Tal como se pode constatar, há uma divisão dos mesmos em dois segmentos, sendo o quarto capítulo inteiramente direcionado para os resultados químicos referentes aos trinta e cinco artefactos estudados, enquanto no quinto, se apontam os resultados e conclusões biológicas de uma última amostra.

1.2 Contextualização

É comum dizer-se que para se dominar o presente é necessário conhecer o passado humano. Quem não se recorda dos fantásticos documentários protagonizados por Zahi Hawass na sua jornada em busca dos mais misteriosos tesouros escondidos nas pirâmides de Gizé ou nos túmulos no Vale dos Reis no Egito, ou das expedições arqueológicas subaquáticas a bordo de Calypso, o mítico navio de pesquisas hidrográficas pertencente ao historiador e arqueólogo Jacques Yves-Cousteau? Aqueles menos recetivos a dados históricos mas entusiastas do cinema certamente lembrar-se-ão dos filmes de aventuras dos “arqueólogos” mais conhecidos do Mundo - Indiana Jones e Lara Croft - nas suas jornadas em busca do *Santo Graal*, ou de um talismã perdido há 5 milénios que pode restaurar o equilíbrio em toda a terra impedindo a sua destruição...

Todas estas expedições, sejam elas reais ou fruto da imaginação de argumentistas do cinema de Hollywood, sugerem a intervenção de arqueólogos competentes para quem cada peça exumada se reveste de elevada importância, podendo um colar ou uma pedra preciosa não ser mais importante do que um vaso do período neolítico encontrado no interior de um dólmen ou uma ânfora romana encontrada no interior de uma embarcação naufragada.

A arqueologia é considerada uma ciência social por se socorrer de textos, comparações de forma ou de outras evidências muitas vezes contestáveis, fornecendo por via indireta conhecimentos da presença humana em contextos culturais, geográficos e cronológicos. Surge portanto a necessidade de acoplar à arqueologia outro tipo de metodologias científicas que não apenas as utilizadas pelos arqueólogos tradicionais, destacando-se como as mais imediatas e eficazes as associações com a Química, a Biologia molecular ou a Geologia. Estas simbioses conferem à arqueologia um cariz científico que outrora lhe faltava.

A sociedade tem progredido ao longo dos séculos ou milénios graças à procura constante de conhecimento. São exemplos dessas aprendizagens a descoberta e a manipulação do fogo, o fabrico de armas a partir de materiais rudimentares obtidos na natureza, a agricultura que conduziu ao sedentarismo, ou vice-versa, e à produção de alimentos em grande escala, a conquista de territórios e conceção de grandes cidades e

impérios, o transporte por terra ou água de produtos entre localidades a pequenas e grandes distâncias que fomentou o desenvolvimento dos meios de transporte, a acomodação de alimentos e bens, etc. Cronologicamente falando, estes acontecimentos não ocorreram de forma instantânea mas sim durante centenas ou milhares de anos segundo processos mais ou menos contínuos, tendo os desenvolvimentos mais “marcantes” sinalizado períodos históricos como a descoberta do fogo, a criação de gado ou o transporte de produtos entre regiões.

1.3 O nascimento das primeiras civilizações

O **Paleolítico**, também chamado de idade da pedra lascada, fica marcado pela descoberta do fogo bem como pelo fabrico e utilização de armas na caça^{1,2} (Figura 1.1). Com o aumento da população ocorrido neste período pela formação de pequenos aglomerados populacionais de nómadas, tornou-se necessária a caça de animais de grande porte, sendo a maioria dos utensílios utilizados fabricados a partir de pedra, ossos e madeira (Figura 1.2). As peles dos animais abatidos eram utilizadas na proteção do frio intenso¹. Este período pode subdividir-se em Paleolítico Inferior (de 2,5 milhões de anos a.C. a 200.000 anos a.C), médio (de 200.000 a 30.000 anos a.C) e superior (de 30.000 anos a.C a 15.000 anos a.C)¹. Nesta altura surgiram provavelmente em África as primeiras espécies de homínídeos que, sendo essencialmente recolectores, se alimentavam daquilo que colhiam na Natureza – frutos, folhas, insetos e animais de pequeno porte.



Figura 1.1 – Utensílios primitivos de caça usados por populações ancestrais que habitaram durante o paleolítico³.

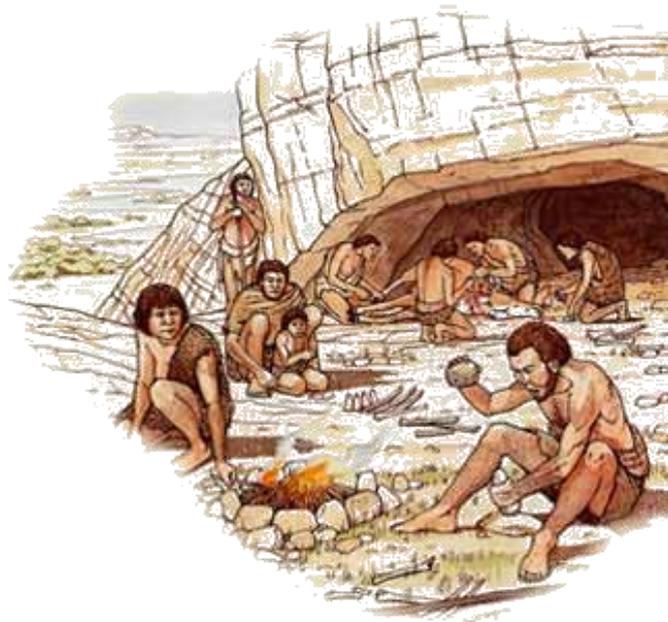


Figura 1.2 – Representação de uma cena do quotidiano ocorrido no paleolítico⁴.

O **Neolítico**, também designado de Pedra Nova ou Período da Pedra Polida, teve o seu início com a sedentarização e o surgimento da agricultura ocorridos aproximadamente a 10.000 a.C e terminado com a Idade dos Metais no terceiro milénio a.C.². Nesta época ocorreu a sedentarização dos povos nómadas que se fixaram preferencialmente em zonas férteis e originaram os primeiros aglomerados populacionais² (Figura 1.3). É nesta época que surgem os primeiros registos de populações organizadas em comunidades dedicando-se à agricultura e à criação de gado. O aumento destas atividades impulsionou o desenvolvimento de instrumentos de trabalho como a enxada, arado, foice ou mó, e de novas técnicas como a cestaria, tecelagem e a produção de cerâmicas. Estas, para além de utilizadas nas mais variadas tarefas diárias (por exemplo para conter alimentos) apresentavam também fins decorativos^{2,6}.

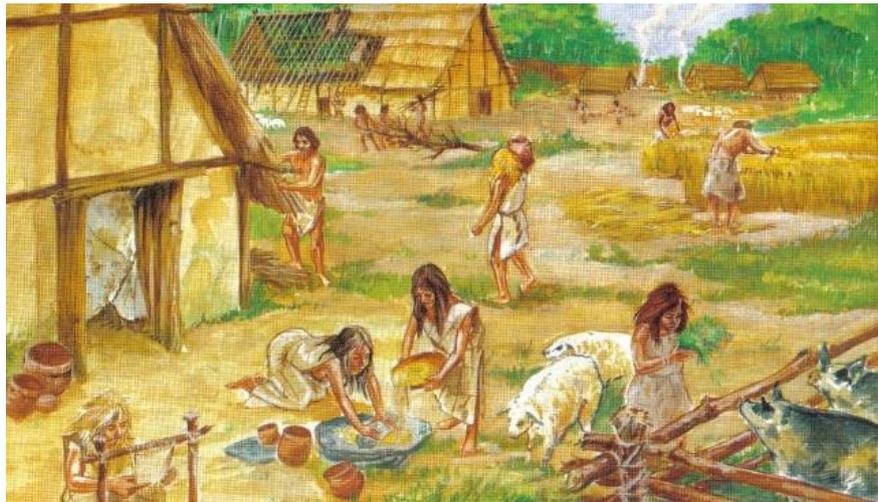


Figura 1.3 – Representação de algumas atividades sedentárias numa comunidade neolítica⁵.

As primeiras comunidades neolíticas produziam quase tudo o que precisavam, desde alimentos a utensílios. Os recursos em excesso eram trocados por bens que não possuíam, dando origem às primeiras atividades comerciais⁶. No neolítico, o Homem prestava culto às forças da natureza (Terra, Sol, Água, Vento), animais e à deusa-mãe. Nesse contexto foram construídos grandiosos monumentos megalíticos como mamoa, menires, alinhamentos, cromeleques ou dólmens. Neste último, eram sepultados os mortos juntamente com as suas armas de combate e os utensílios que mais utilizavam na sua vida terrena^{2,6}. São de destacar algumas oferendas encontradas nestes túmulos, por vezes incluindo materiais cerâmicos contendo alimentos ou óleos essenciais. Em 2010, uma investigação realizada por Barnard e colaboradores⁷ detetou a presença de compostos orgânicos indicadores de vinho em fragmentos cerâmicos datados de 4.000 a.C.. Com a agricultura surgiram em locais férteis as grandes civilizações, normalmente nas margens de grandes rios. Atente-se à civilização **Suméria** (o nome deriva do grego e significa *entre rios*) que se desenvolveu na região da Mesopotâmia, entre os rios Tigre e o Eufrates.

A **civilização egípcia** conta-se entre aquelas que perduraram por mais tempo, tendo existido durante cerca de três mil anos. Neste período governaram o Egito trinta famílias ou dinastias totalizando mais de duzentos faraós⁸. Toda a civilização egípcia se desenvolveu-se ao longo das margens do rio Nilo (diz-se “*O Egito é um dom do Nilo*”) onde se concentravam as populações, cidades, pirâmides, templos e toda a vida económica do reino⁸. Graças às suas conhecidas cheias anuais, as terras eram tornadas férteis para a agricultura, o principal meio de sustento da população egípcia (Figura 1.4). Fora dos vales verdejantes da sua “área de influência” apenas restavam áreas áridas onde nada crescia. Os Egípcios eram politeístas, chegando a venerar simultaneamente centenas de deuses aos quais faziam várias oferendas diárias como alimentos e bebidas¹⁰.

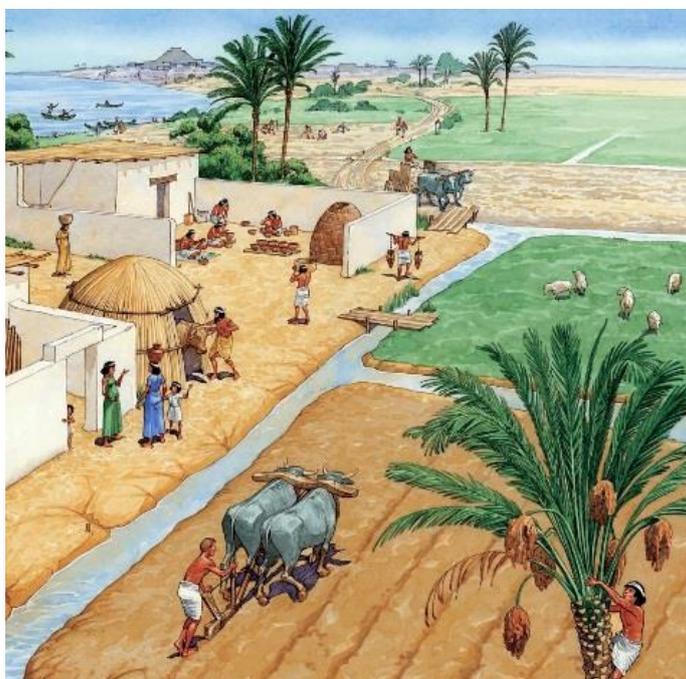


Figura 1.4 – Desenvolvimento da civilização egípcia sobre as margens do Nilo⁹.

Como todos os grandes impérios, os egípcios recorriam ao comércio para a obtenção de produtos que não conseguiam produzir localmente (Figura 1.5). Apesar de não serem viajantes e preferirem permanecer junto às margens do seu rio, efetuavam expedições comerciais onde os produtos mais requisitados eram a madeira de cedro, o incenso, o marfim, as peles de animais selvagens, animais e plantas. Como material para troca utilizavam os produtos locais mais abundantes como os unguentos, os preparados piscícolas, o trigo, o mel, o vinho, o papiro, o linho, perfumes e o azul egípcio, um

pigmento sintético utilizado na pintura que era fabricado a partir de sílica e de cobre fundidos. Todos estes bens eram transportados em contentores especificamente construídos para o produto em questão^{8,10}, sendo os principais as ânforas e os grandes *dolium* dependendo do tipo (líquido ou sólido) e da quantidade de material a transportar¹⁰.

Os egípcios acreditavam na vida além-túmulo. No entanto, a imortalidade estava exclusivamente reservada para o faraó e as elites de elevadas patentes, cujo corpo era embalsamado e mumificado de forma a impedir que se transformasse em pó, permitindo assim a sua entrada no chamado *Reino de Osiris*. Os embalsamadores começavam por retirar as vísceras (órgãos internos) e cobrir a “múmia” de perfumes e unguentos, gorduras associadas a resinas produzidas especificamente para a preservação da múmia, que era posteriormente enfaixada, normalmente em **linho**¹⁰.



Figura 1.5 – Exemplo de expedição marítima por parte de comerciantes egípcios para a comercialização de produtos (1420 a.C.)¹¹.

O mundo ocidental foi marcado pela existência de diferentes impérios que promoveram o desenvolvimento de atividades como o comércio de produtos (essencialmente alimentares, mas não apenas estes), tornando obrigatório o transporte dos mesmos em contentores para isso desenvolvidos. Foi durante o apogeu da civilização Grega que se construíram os chamados vasos de cerâmica comum (*commonware*) que apresentavam diferentes possibilidades de utilização, assim como os vasos para cozinha (*cookware*) e outros para o armazenamento de perfumes e unguentários. Neste período os elementos mais ilustres da comunidade grega bebiam vinho (e outras bebidas) em *Oenochoe*, jarros que mais tarde viriam a ser chamados de **picheis**^{13,14}, utilizados para o consumo local e não para transporte de bebidas (Figura 1.6).



Figura 1.6 – Exemplo de uma *Oenochoe* grega para armazenamento temporário de líquidos¹².

Com a romanização, ou seja, com a disseminação do império romano por toda a Europa deu-se o incremento do volume de produtos importados, principalmente de bens alimentares como cereais, vinhos, mel, ou preparados de peixes, o que levou à necessidade de construir e utilizar em grande escala contentores que fossem adaptados ao transporte desses produtos. Os contentores mais comuns eram as ânforas, grandes contentores como as dólias (no plural *dolium*) e outros potes de formas diversas, todos fabricados a partir de argilas por serem materiais pouco dispendiosos e facilmente moldáveis¹⁵. Neste contexto, surgiram as olarias que se dedicavam exclusivamente ao fabrico para todo o império deste tipo de recipientes de transporte de produtos líquidos

e sólidos. *Bracara Augusta* surge a noroeste da Península Ibérica como um grande produtor de cerâmicas destinadas à exportação de produtos, mas também como um grande importador de outros provenientes das mais distintas províncias do império^{16,17}.

Estes contentores variam entre si na forma, para melhor se adaptarem ao transporte e armazenamento dos produtos a que se destinam. Por exemplo, num determinado período era frequente integrar *dolium* na estrutura dos barcos, transformando-os em navios de carga que serviam para transportar bens alimentares em elevadíssimas quantidades. Já as ânforas utilizadas desde a antiguidade serviam para o transporte e não tanto para o armazenamento de produtos líquidos e sólidos, tais como cereais, azeitonas de conserva, vinho, mel, preparados piscícolas, azeite e frutos¹⁶. A sua forma final normalmente depende do produto a transportar. Contudo, a maioria das ânforas apresenta uma estrutura globular e o fundo em bico, o que facilitaria o seu transporte nos porões de navios^{15, 18} (Figura 1.7).



Figura 1.7 – Representação de um conjunto de contentores cerâmicos armazenados num típico porão romano¹⁹.

Depois de consumido o seu conteúdo e esvaziado o contentor cerâmico, este poderia ser reutilizado com novos produtos ou desmantelado e utilizado como material de construção em pavimentos, muros, etc²⁰. A título de exemplo pode referir-se o caso de Roma, que por ser a capital do império era também um grande centro consumidor de bens alimentares, sendo enorme o volume de contentores cerâmicos que diariamente lhe chegava vindo das províncias. Por ser mais dispendioso o

reaproveitamento ou reenvio destes contentores para as províncias de origem, estes eram destruídos e os seus fragmentos atirados para um vale nas imediações de Roma. Foi de tal forma elevado o volume de fragmentos aí depositados que nesse local existe agora um monte de restos cerâmicos com cerca de 40 metros de altura - *Monte de Testaccio* (Figura 1.8).



Figura 1.8 – Monte Testaccio, Roma²¹.

Os produtos mais comercializados na altura eram i) o **vinho**, comercializado em enormíssimas quantidades por todo o império, abastecendo tanto cidades como as legiões de soldados²²; ii) o **mel**, utilizado não só como edulcorante²³ mas também para dar sabor ao vinho e à cerveja; iii) **carnes e preparados piscícolas** utilizadas na alimentação, transportadas principalmente para as populações distantes das zonas costeiras; iv) o **azeites e azeitonas** de conserva²⁴. São também frequentes as referências a outros tipos de produtos como por exemplo as **gorduras animais** que serviriam como combustível em lucernas para iluminação²⁵ ou mesmo **resinas** de pinheiro que eram utilizadas no revestimento e impermeabilização de contentores destinados ao transporte de líquidos²⁶.

Com as invasões bárbaras e o declínio do Império Romano deu-se início à **época medieval**, formando-se as primeiras células das futuras nações europeias²⁷. Naquela

altura, como atualmente, a preocupação em atingir o desenvolvimento económico levou ao estabelecimento de importantes relações comerciais entre as nações, tendo-se destacado pela sua importância aquelas que envolveram o comércio de produtos alimentares^{27,28}. Estabeleceram-se nesta época circuitos comerciais que ligavam o mediterrâneo à atual Inglaterra e países Nórdicos tendo Portugal como ponto de passagem e de comércio. Em Portugal, os principais produtos de exportação estavam ligados à agricultura (azeite, cortiça, frutos, vinho) e mar (pescado e sal), havendo interesse na importação de produtos como tecidos, armas e óleos de gorduras animais (focas, baleias, etc. que serviriam para dar chama às já existentes *candelas* destinadas à iluminação)^{25,28}.

1.4 A argila como material de construção

Frequentemente, os químicos que trabalham em materiais arqueológicos têm para análise fragmentos provenientes de épocas diferentes, pertencentes a materiais de diversas formas e finalidades. Foram inúmeras as matérias-primas utilizadas na antiguidade para o fabrico de contentores e utensílios - **ossos de animais** e **marfim** que serviriam para tarefas domésticas básicas^{1,2}, pedras (**pedra de sílex**) comumente utilizadas como arma de caça^{1,2}, **tecidos básicos (linho)** utilizados como vestimentas¹⁰ e principalmente materiais à base de **argila** que pela sua enorme abundância foi desde muito cedo aproveitada para dar origem aos mais variados vasos cerâmicos²⁴ que ainda hoje em dia são utilizados no nosso quotidiano.

O incremento das trocas diretas de produtos ocorrido ainda no período Neolítico², bem como o desenvolvimento das atividades comerciais nas diferentes civilizações que lhe sobreviveram^{27,28} criou a necessidade de transportar produtos a médias e longas distâncias. Lembra-se o ocorrido durante o processo de Romanização, onde a alimentação das tropas e dos grandes núcleos populacionais habitados por sociedades florescentes implicou o transporte entre as várias províncias do império de enormíssimas quantidades de produtos alimentares²². Assim, tornou-se necessário o fabrico de contentores adequados ao transporte desses bens alimentares para as diferentes províncias em condições de salubridade. A argila foi o material de eleição por ser abundante, barato, facilmente moldável e muito resistente. Neste contexto sofre um

forte aumento o número de barreiros destinados à extração de barro, assim como as olarias dedicadas à moldagem, secagem e cozedura de argilas²⁴.

As argilas utilizadas na produção de contentores podem ser de diferentes tipos, dependendo a sua própria constituição da região de onde são extraídas²⁹. Estas podem apresentar diferentes tipos de minerais, como a caulinite, ilite, montemorilonite, entre outros, o que transmite à constituição da cerâmica uma estrutura granular de grãos com dimensões reduzidas ($< 4 \mu\text{m}$)^{29,30}. Graças ao facto das cerâmicas serem materiais porosos, é possível a aplicação de um conjunto de técnicas de análise química (XRD, XPS, SEM) para se obter informação quanto à origem da argila e processos de tratamento como a temperatura de cozedura ou a cristalinidade dos minerais, entre outros aspetos³⁰. As argilas são facilmente moldáveis em contacto com a água e estabilizadas quando aquecidas. Normalmente as suas partículas apresentam uma estrutura laminar, com superfícies elevadas, apresentando-se carregadas negativamente nas faces e positivamente nos bordos. Cada partícula de argila pode absorver moléculas de água, o que promove a passagem dos catiões dos bordos para as zonas carregadas negativamente, tornando o conjunto eletricamente neutro^{31,32}. Assim, com a entrada de água, acabam por penetrar também espécies orgânicas solúveis provenientes do conteúdo dos recipientes, ficando lá aprisionadas e preservadas, uma vez que são reduzidos os processos de degradação, levando a uma chamada “memória ancestral” da cerâmica²⁴ (Figura 1.9).

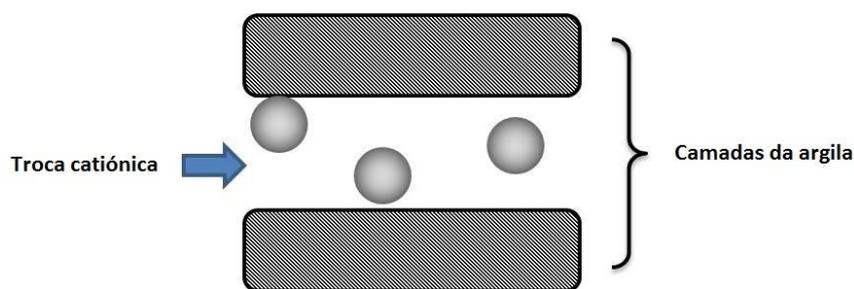


Figura 1.9 – Passagem de íões pelas camadas mais interiores da argila³³.

A aplicação de uma técnica de análise apenas é possível por as argilas serem extremamente resistentes a todo um conjunto de fatores, que em condições normais poderiam deteriorar a estrutura dos contentores¹⁹. É de lembrar que além da degradação natural de alguns compostos químicos com a passagem de centenas ou

mesmo milhares de anos, na maior parte dos casos estes materiais cerâmicos estiveram subterrados por períodos elevados, estando sujeitos à ação de microrganismos, elevadas temperaturas e pressões, ou submersos em água onde estiveram sujeitas a elevadas pressões e lixiviações constantes.

1.5 As diferentes tipologias de contentores cerâmicos

A cerâmica representa a mais comum e abundante categoria de material portátil que há conhecimento. Usado desde a antiguidade para o desempenho de funções básicas do quotidiano, cerâmicas são hoje em dia reconhecidas pela capacidade de nos enriquecer culturalmente pelo conjunto de informação arqueológica capazes de fornecer. Inicialmente, estudos a este material eram focados na sua tipologia e cronologia, contudo, a partir dos anos 70, abraçou-se a ideologia que estes bens constituíam uma importante fonte de informação sobre vários aspetos da vida económica do mundo antigo³⁴. A partir desse momento, todas as investigações foram abordadas de forma mais aprofundada, aproximando temáticas como a **geografia**, organização e tecnologia de **produção** de cerâmicas, mecanismos e intensidade de **distribuição, consumo, uso** e características de **desempenho**³⁴. O que torna este material tão especial, é a capacidade de ser moldado em qualquer aspeto que o Homem idealize para ele. Com essa característica, surge a singular aptidão planeada pelo Homem para criar vários tipos de contentores, sendo que cada exemplar era unanimemente utilizado para transportar/conter apenas um tipo de produtos. Assim, surgem várias tipologias de **classes de contentores**, cada um especializado no desempenho de uma tarefa específica. Neste trabalho, são apresentadas algumas dessas classes³⁴.

1.5.1 – Ânforas

As ânforas são o tipo de contentor mais conhecido. Produzidas habitualmente em argila ou terracota, conhecem-se exemplares desde a idade do bronze (onde foram desenvolvidas pelos Gregos) apresentando na altura uma característica forma ovoide com duas alças simétricas³⁵. Estes contentores portáteis coexistem em muitos modelos

diferentes, com os mais pequenos com capacidade de armazenamento de 5 a 6 L e os maiores de 150 L³⁴. Eram vastamente empregados para desempenhar funções de armazenamento e transporte de curtas e longas distâncias de vários produtos, como vinho (neste caso entram produtos como o vinho adocicado (*mulsum*), vinho com vinagre (*acetum*), sumo de uva (*sapa*) e sumo de uva cozinhado (*caroenum*, *defrutum* e *decotum*), óleos vegetais, azeite (*oleum*) e azeitonas de conserva, frutas, preparados piscícolas como o peixe envolto de sal (*salsamentum*) ou mesmo os vários tipos de molhos de peixe (*garum*, *liquamen*, *allec*, *muria*), carnes, leite, etc³⁶. Por serem um material tão barato de obter, era usual serem destruídos após a sua utilização - há no entanto casos em que estas eram reaproveitadas para o armazenamento e transporte de produtos, muitas vezes diferentes daqueles incluídos na primeira utilização³⁴. Sendo produzidas em grande escala até ao séc. VII d.C, foi durante a época de domínio do império Romano que se deixou de fabricar o tipo padronizado de ânforas (até à data eram todas similares entre si, apenas variavam os desenhos e cores da parede exterior), e se começaram a fabricar diferentes classes³⁶. Assim surge uma vasta gama de ânforas, sendo cada uma delas geralmente manufaturadas numa região geográfica singular. Algumas evidências sugerem na maioria dos casos que os vasos pertencentes a uma classe específica continham uma mesma substância comum, sendo referida portanto como o “*principal conteúdo da classe*”³⁴. Apresentam-se de seguida alguns exemplos de ânforas originárias em regiões geográficas distintas:

- **Lusitanas:** as ânforas Lusitanas surgem no contexto da produção de contentores na Península Ibérica, tendo assumido uma condição singular³⁷. Inspiradas nas tipologias características das *Italianas* e das *Béticas*, estas ânforas assumem uma grande variedade de formas. São geralmente caracterizadas por terem bocais, asas curtas e um corpo cilíndrico (Figura 1.10), sendo similares a um já conhecido tipo de ânforas antigas da Bética, as *Haltern 70*, sendo portanto chamadas de “pequena variação”^{37,39}. Tendo em conta a sua manufatura, pensa-se que estas produções são provenientes de olarias localizadas ao longo dos rios Tejo e Sado, com provável prevalência para o último. Para além destes centros de produção, são também conhecidas olarias em Morraçal da Ajuda, Peniche datadas do tempo de Octávio Augusto (o primeiro imperador Romano)³⁹. Um dos mais interessantes problemas relatados sobre o estudo destas ânforas está

associado à questão dos produtos preferencialmente transportados. Para ânforas Lusitanas, é normal que se pense (devido à sua área de fabrico) que estejam associados ao transporte de preparados piscícolas³⁹.



Figura 1.10 – Réplicas de ânforas Lusitanas³⁸.

- **Lugo:** ânforas provenientes da capital administrativa da região da *Gallaecia* setentrional, a antiga *Lucus Augusti* (atual cidade de Lugo) foi fundada sobre as estruturas de um antigo acampamento militar por Paulo Fabio Maximo, legado de Augusto entre os anos 15-13 a.C. ⁴⁰. As ânforas descobertas ao longo desse território revelaram-se, após estudos realizados como “macroscopicamente desconhecidas” quanto ao tipo de pastas que construíam as cerâmicas. Por essa razão, estes contentores foram imediatamente identificados como novidades. Uma vez identificadas as pastas, foi necessário a sua classificação de acordo com a tipologia apresentada, nomeadamente quanto ao formato (lábios, asas, pivôs, curvatura da parede, etc.). Assim, concluiu-se da existência de dois tipos de ânforas de produção local referentes às escavações de Lugo: as conhecidas por Castro 1 e Local 1 ^{40, 41}.

As ânforas de Lugo Castro 1 definem-se por terem uma boca de grande diâmetro e um lábio vertical moldurado. Apresentam uma pasta cerâmica cinzenta devido a uma redução do tempo de cozedura. São basicamente constituídas por minerais como a mica biotita, quartzo, ortosa alterada, ortoclasa e plagioclasa. São estes elementos os

denunciadores do local de produção dos contentores. Trata-se de uma pasta de origem granítica comum na área, seguramente, material adquirido das imediações do rio Minho⁴¹. As ânforas de Lugo Local 1 correspondem a um segundo exemplar com uma pasta cerâmica muito similar ao Castro 1 (obvio, visto que são do mesmo local). Contudo, apesar de serem detetados na sua constituição, elementos como ortosa, quartzo, mica biotita (em lâminas de tamanho maior), a sua cor é castanha⁴¹ (Figura 1.11).



Figura 1.11 – Conjunto de ânforas de Lugo de fundo plano⁴².

Desconhece-se o conteúdo original destas ânforas. Todavia, uma vez que a cidade romana de *Lucus Augusti* se encontra delimitada pelos rios Minho e Rato, é provável que se destinassem ao transporte de preparados piscícolas⁴⁰. Contudo, visto que todos os exemplares de ânforas de Lugo desenterradas nas imediações da cidade apresentam um fundo plano⁴¹, existe a hipótese destas se destinarem a outras funções, uma vez que o fundo plano associa-se ao transporte de produtos líquidos⁴⁰, enquanto as tipologias estreitas e compridas estão associadas a produtos sólidos como preparados piscícolas⁴¹.

- **Buéu:** pensa-se que estas ânforas produzidas em Pontevedra, no noroeste da Península Ibérica, se destinam ao transporte de produtos piscícolas⁴³. Esta hipótese é assegurada não só pela localização geográfica do seu local de produção, mas também pelos costumes dos habitantes nas épocas mais distantes (o mesmo se verifica nos dias correntes), que viviam a atividade piscatória de uma forma muito real e severa. Alguns registos literários demonstram a existência de comércio de preparados piscícolas desde

Buéu para o resto do império Romano, destinando-se ao abastecimento de legiões de soldados (preparados mais módicos e baratos) e ao cumprimento de costumes das elites Romanas (o *Garum* era considerado um material rico e fino que apenas algumas classes conseguiriam adquirir)⁴³. Estas ânforas (Figura 1.12) são conhecidas por apresentarem uma pasta totalmente branca, pouco dura e muito micácea, abundante em quartzo e hematite de diferentes tamanhos. A existência do centro produtor de San Martiño de Bueu (Pontevedra) está inequivocamente corroborado por recentes escavações que permitiram identificar uma fábrica de peixe e uma oficina de produção de ânforas⁴¹.



Figura 1.12 – Conjunto de diferentes ânforas de Buéu⁴⁴.

- **Béticas:** Esta classe de contentores encontra-se representada num vasto espectro cronológico, desde o período republicano até ao Baixo-império e relacionam-se com o envase de preparados de peixe, azeite e vinho⁴⁵. O melhor momento documentado no que respeita a importações anfóricas é sem dúvida a época republicana, momento em que a província da *Bética* (Vale do Guadalquivir) e *Itália* se assumem como centros abastecedores por excelência, apesar de algumas ânforas norte Africanas desta cronologia também terem sido recolhidas⁴⁶. Estas ânforas comuns apresentam uma pasta de cor rosada, acastanhada ou cinzentas com uma capa superficial esbranquiçada, estando incorporados na sua constituição quartzo e feldspato^{41, 46}. Dentro desta tipologia de contentores, podem ser inseridas muitas outras classes. São exemplos as i) Dressel 2-4, uma variante das béticas com corpo cilíndrico, asas largas, lábios arredondados e um pivô sólido⁴¹; as ii) Dressel 7-11, ânforas ovoides de boca aberta,

lábios moldurados, asas planares largas e um pivô oco; e iii) as Dressel 20 Parva, variantes de pequenas dimensões para o transporte de líquidos como vinho ou azeite. De proporções extremamente elevadas, as Haltern 70 são unanimemente consideradas como sendo as mais populares em todo o Noroeste da Península Ibérica (Figura 1.13), apresentando um corpo ovoide, asas cónicas, lábios envasados e pivô sólido, e sendo utilizadas quase exclusivamente n transporte de azeite e óleos vegetais⁴¹.

Dentro das ânforas béticas encontramos também a tipologia *urceus*. As *urceus* 1, conhecidas por serem pequenas (máximo de 50 cm) de fundo plano e com um bordo largo e saliente, serviriam unicamente para o transporte e armazenamento de vinho (ânfora vinária). De salientar que existem para além das referidas, muitas outras classes para a tipologia de ânforas Béticas de relevante estudo e preocupação.



Figura 1.13 – Ânfora bética do tipo Haltern 70⁴⁷.

1.5.2 – *Dolium*

Os *dólia* ou *dolium* eram enormes contentores que podiam encontrar-se em terra ou fixados no interior de embarcações destinando-se ao transporte por via marítima de grandes quantidades de produtos (Figura 1.14). Entre outros, era usual que estes grandes vasos transportassem mercadorias como vinho, azeite ou grainhas. As suas capacidades poderiam estar compreendidas entre os 400 e os 3000 L⁴¹.

Contrariamente ao que se passava com as ânforas, estes contentores eram de produção bastante dispendiosa, representando por isso investimentos substanciais. Por isso mesmo, e devido ao seu enorme peso e tamanho, a sua troca era representada como um enorme inconveniente, daí a sua frequente reutilização⁴⁹. Estes contentores, uma vez em terra, seriam mantidos na mesma localização durante anos, senão décadas, sendo em muitos casos parcialmente enterrados (os chamadas *dólias de fossa*). Na maioria dos casos os *dólias* apenas seriam abandonados após longos períodos de atividade, quando o seu conteúdo começava a adquirir sabor desagradável pelo contacto com as paredes cerâmicas que continham uma enorme quantidade de resíduos absorvidos^{50, 51}.

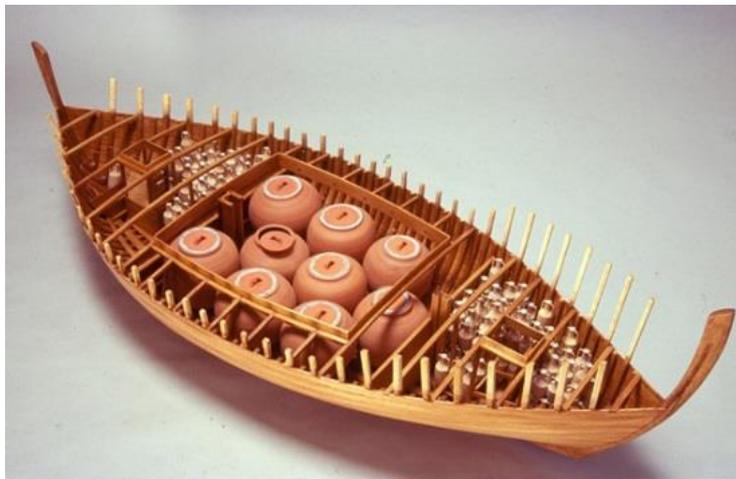


Figura 1.14 – Representação do transporte de *dolium* no interior de embarcações⁴⁸.

1.5.3 – Outras tipologias de contentores

Para além dos contentores anteriormente apresentados, com tipologias bem definidas, revestiram-se de enorme importância outros contentores com formas distintas e utilizações variadas. Entre esses, podemos referir os potes meleiros e colmeias cerâmicas, candelas e lucernas, picheis ou diferentes vasos de uso diário:

– **Potes meleiros e colmeias cerâmicas:** os primeiros testemunhos de contentores para o transporte de mel datam da Idade do Bronze, como comprovam alguns frescos egípcios da XV dinastia (meados do II milénio a.C.) e algumas tabuinhas de Linear B

micénicas (2ª metade do II milénio)⁵². Outros contentores usados no transporte de mel são referidos em papiros da época ptolemaica⁵². A maioria dos contentores recuperados pela arqueologia são da época Romana e Bizantina⁵². Em recipientes usados para o transporte e a conservação de mel (potes meleiros) reconhecem-se formas específicas, especialmente adaptadas para este fim (Figura 1.15), documentadas por toda a bacia mediterrânica⁵⁴. Estes caracterizavam-se por possuir um característico ressalto muito saliente (mais raramente dois) em forma de aba ou “pestanda”, frequentemente situada a cerca de um terço da parte superior do pote ou situada na proximidade da boca. Esta “pestanda”, ao ser preenchida com água, apresentava duas funções distintas – impedir que insetos como formigas chegassem ao produto e, por outro lado, evitar que este escorra ao longo das paredes exteriores da cerâmica²³.



Figura 1.15 – Pote meleiro romano, atualmente exposto no Museu D. Diogo de Sousa⁵³.

A par destes recipientes, sabe-se que no Mundo antigo, pelo menos a partir do IIIº Milénio a.C, se utilizavam colmeias de terracota posicionadas na horizontal. No Mundo Romano, este tipo de colmeias são bem documentadas pela arqueologia⁵². Peças cilíndricas entre 24 a 29 cm de diâmetro e uma altura entre 53 e 58 cm, que se caracterizam por terem bordos muito diferenciados e uma superfície interna propositadamente estriada para facilitar a aderência dos favos de mel⁵². A contextualização arqueológica indica que estas se dispunham separadas ou empilhadas diretamente sobre o solo ou colocadas sobre muretes. Posteriormente seriam fechadas com tampões de cortiça, madeira, cerâmica ou barro, deixando-se um pequeno orifício

para permitir a entrada das abelhas, sendo seladas nas juntas com barro ou esterco para uma melhor aderência e, simultaneamente evitar a intrusão de insetos ou de outros animais⁵⁵.

– **Lucernas e candelas:** as lucernas (Figura 1.16) são pequenos utensílios em terracota utilizados desde a antiguidade e aperfeiçoados pelos Romanos pela necessidade de luz artificial para desempenhar muitas tarefas diárias⁵⁷. Estes contentores eram fechados com exceção de três pequenos orifícios, um próximo do centro da lucerna que serviria de depósito de combustível (*Infundibulum*), um segundo mais distante do centro que serviria para o arejamento e um último na extremidade que serviria para a chama (*Ellychnium*). Estes contentores possuíam uma asa típica para transporte (*Ansa*) na extremidade oposta à chama, e continham frequentemente ilustrações de cenas eróticas, de gladiadores em batalha, cenas mitológicas ou padrões florais. Eram produzidos em grande escala a partir de moldes pelo que se comercializavam a preços reduzidos⁵⁷.



Figura 1.16 – Exemplo de Lucerna romana exposta atualmente no Museu de Conimbriga⁵⁶.

As candelas (Figura 1.17) são as antecessoras das lucernas (o primeiro exemplar conhecido pertence à idade Calcolítica) diferindo destas no facto de não serem fechadas, dado o combustível ser colocado próximo da chama, e usar-se uma espécie de pavio⁵⁹.



Figura 1.17 – Exemplo de Candela romana, atualmente exposta no Museu de Conímbriga⁵⁸.

– **Picheis:** estes eram contenedores que tinham como função o armazenamento temporário de líquidos. Existentes desde a antiguidade clássica, foram desenvolvidos pelos Gregos com o fabrico da classe conhecida como *Oinochoe* (Figura 6). Os picheis são no entanto muito comuns em estações de cronologia pleno-medieval como Conímbriga⁶⁰.

Apesar de se conhecer a existência de exemplares de diferentes tipologias, os mais volumosos seriam de porte inferior às ânforas, enquanto os mais pequenos seriam suficientes para que as crianças da época os utilizassem para se acostumarem ao sabor do álcool, normalmente vinho normalmente⁶¹.

– ***Eware e Cookware:*** os *eware* ou vasos de uso diário são utensílios muito comuns em escavações, existindo em inúmeras formas e classes. Por exemplo, os almofarizes (*mortaria*, associados normalmente a um pilão) (Figura 1.18) eram utilizados para esmagar alimentos (cereais por exemplo) ou outro tipo de materiais. Por serem frágeis e partirem frequentemente, eram correntemente substituídos. Em contraste, muitos vasos utilizados na conservação de alimentos, por estarem menos sujeitos a riscos físicos, poderiam mais facilmente perdurar por muitos anos³⁴. Estes vasos para além de conservarem alimentos, também eram muitas vezes usados para guardar outros produtos, como unguentários e perfumes ou pigmentos para pinturas³⁴.



Figura 1.18 – Almofariz romano encontrado na villa romana de Chedworth⁶².

Os *cookware* ou vasos para cozinha (Figura 1.19), dado serem vasos cerâmicos de utilização diária e intensiva, apresentavam tempos de vida muito curtos, normalmente inferiores a um ano^{34,64}. A sua repetida exposição a ciclos de aquecimento e arrefecimento originava processos de stress térmico que culminavam com a destruição dos vasos. Ao mesmo tempo, o repetido uso de *ollae* (panelas) ou *caccabi* (caçarolas) para cozinhar/aquecer comida e bebida podiam resultar na absorção de resíduos variados para as paredes cerâmicas, o que provocava mau sabor aos alimentos neles cozinhados ao fim de algum tempo de utilização ⁶⁴.



Figura 1.19 – Conjunto de utensílios de cozinha romana, atualmente expostos no Museu de Conimbriga⁶³.

1.6 Mamoas e outros alvos de pinturas ancestrais

As mamoas são monumentos funerários megalíticos cuja origem remonta à época Pré-histórica (Figura 1.20). Muitos destes monumentos, onde também se incluem dólmens (Figura 1.21), menires, antas e cromeleques, apresentam vestígios de pinturas ancestrais⁶⁷ obtidas através da mistura de materiais retirados da natureza, como óleos vegetais, têmpera de ovos, minerais inorgânicos, etc.⁶⁸. Apesar de os grafismos mais habituais parecerem à primeira vista abstratos, representam sempre motivos esquemáticos racionais. Atualmente acredita-se que algumas destas pinturas tenham-se revestido de significado simbólico para as comunidades pré-históricas que celebravam cerimónias mágico-religiosas nestes monumentos.

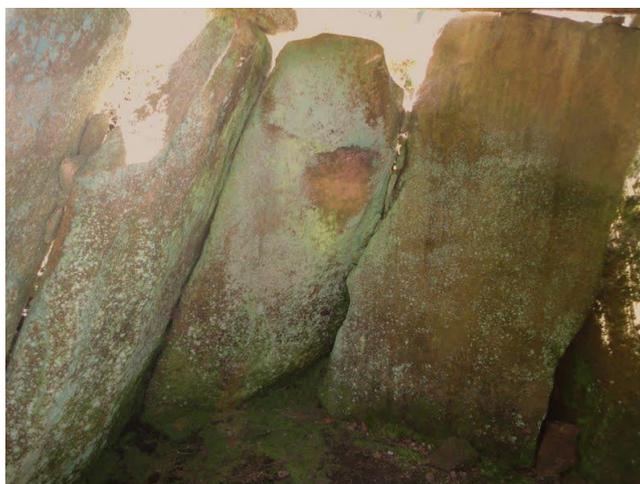


Figura 1.20 – Mamoas do Batateiro, um túmulo megalítico com cerca de 5 mil anos, localizada em Melgaço, em plena Serra da Peneda, que apresenta pinturas ancestrais⁶⁵.

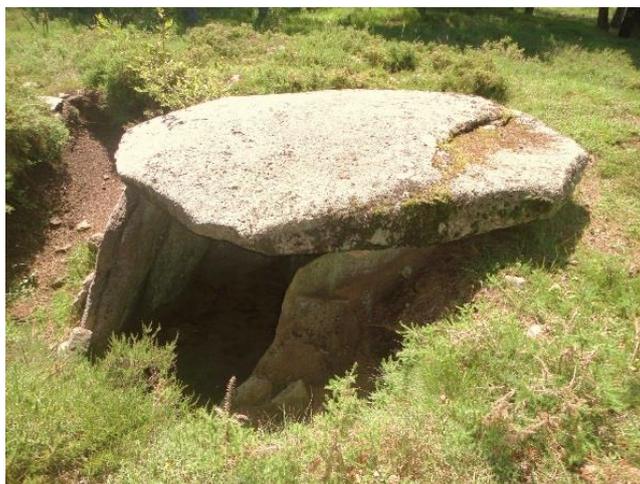


Figura 1.21 – Dólmen do Batateiro, onde está inserida a Mamoas pintada do Batateiro⁶⁶.

1.7 Análise química e biológica de artefactos arqueológicos

Atualmente é reduzido o número de equipas multidisciplinares que se dedicam à análise de artefactos arqueológicos, o que explica a imensa procura de grupos de investigação que se dedicam a este tipo de serviços. Paralelamente, existe uma crescente consciencialização dos arqueólogos acerca da necessidade de complementar os seus trabalhos com dados científicos que comprovem ou refutem as suas premissas postuladas em evidências, por vezes pouco científicas.

Graças aos constantes avanços científicos nas áreas da química analítica e da biologia molecular é possível a aplicação de técnicas avançadas de análise sobre estes materiais ancestrais, permitindo obter-se informações científicas que outrora seriam impossíveis. Neste contexto, procurou-se aliar à arqueologia uma forte contribuição da química analítica e da biologia molecular, de forma a melhor complementar as informações obtidas pelas equipas de arqueólogos.

Deste modo, o trabalho executado apresenta dois grandes objetivos:

- I. Utilizando técnicas puramente analíticas, extrair, analisar e identificar os traçadores moleculares presentes nos resíduos orgânicos de cada artefacto revisto, de modo a perceber-se qual seria o seu conteúdo original.
- II. Aplicar metodologias de genética molecular sobre o conteúdo de um grande contentor cerâmico detetado a sul de Portugal, de forma a se proceder à extração e amplificação de moléculas de ADN remanescente, e assim, se identificar quais as espécies de seres vivos que estarão na origem do seu conteúdo original.

Capítulo 2

Arqueometria

2.1 – A arqueometria – etapas de um processo analítico

A arqueometria é um conjunto de técnicas analíticas cuja utilização visa complementar os trabalhos arqueológicos com evidências científicas. Sendo multidisciplinares as análises arqueométricas, é obrigatória a contribuição de especialistas de diferentes especialidades nas várias fases do processo de análise. Entre outros, destacam-se i) o arqueólogo enquanto responsável pela recolha do material a analisar (amostragem) e a respetiva contextualização do extrato arqueológico, ii) o geólogo ao situar temporalmente a camada geológica intervencionada e iii) o químico e o biólogo na análise dos materiais resgatados. A etapa de amostragem é considerada a mais importante do processo analítico, dado pequenos erros poderem impedir a obtenção de resultados cientificamente válidos. Esta etapa resulta na seleção de amostras representativas e livres de contaminações que possibilitem a realização de trabalho laboratorial, minimizando-se as incertezas.

Num trabalho arqueométrico pretende-se efetuar análises preferencialmente sobre materiais sujeitos a manuseamentos e perturbações mínimos de forma a melhor se manterem nas condições originais, o mais próximo possível do estado em que terão sido encontrados. Por outro lado, os arqueólogos procuram apresentar os seus materiais “limpos” de forma a melhor evidenciar a sua forma ou os preparar para exposição, pelo que neste processo podem eliminar vestígios importantes para as análises ou introduzir contaminações. De facto, é frequente a contaminação das amostras a analisar por incorreto manuseamento das mesmas. Uma vez no laboratório é crucial a utilização de luvas e assegurar a limpeza de bancadas e material de vidro. Este deve ser lavado previamente à utilização em solução cromo-sulfúrica ou outra equivalente, seguindo-se várias lavagens com água ultrapura.

São também comuns outras fontes de contaminação/degradação das amostras⁶⁹, nomeadamente:

- i) artefactos que ficam soterrados durante centenas ou milhares de anos, sofrendo contaminações e/ou alterações da matriz orgânica por ação microbiana, bacteriana entre outros;

- ii) ocorrência de lixiviação em amostras presentes em meio subaquático ou perto de linhas de água, podendo levar à eliminação de espécies solúveis;
- iii) perda de compostos orgânicos em amostras subaquáticas ou soterradas, submetidas a pressões e/ou temperaturas elevadas;
- iv) degradação ou eliminação de compostos orgânicos pela lavagem inadequada de artefactos recorrendo à utilização de materiais inapropriados como detergentes ou panos humedecidos, o que impossibilita ou pelo menos condiciona as análises arqueométricas posteriores;
- v) introdução de contaminantes na amostra pela não utilização de luvas aquando da amostragem.

No caso de artefactos soterrados dever-se-á no momento de amostragem recolher materiais adjacentes à peça pois estes podem conter compostos orgânicos provenientes do artefacto. De seguida, sem qualquer tratamento adicional dever-se-á raspar um pouco da peça e transferir o raspado para um envelope de alumínio limpo. O fragmento para análise deverá ser lavado somente com água e seco em papel.

São diversas as tipologias de fragmentos arqueológicos que podem ser estudados. Neste trabalho dar-se-á preferência à análise de fragmentos cerâmicos pela sua elevada capacidade para preservar compostos orgânicos no seu interior, razão suficiente para a existência de inúmeros exemplares em estudo. Em oposição aos materiais cerâmicos, pode ser difícil de obter o mesmo tipo de informação em materiais vidrados ou contentores metálicos, dada a sua reduzida capacidade de adsorção de materiais orgânicos. Nestes casos não será possível determinar-se quais os produtos orgânicos que estiveram em contacto com o metal, pelo que o estudo deverá focar-se em propriedades inorgânicas, que no caso das ligas metálicas serão a sua composição química, resistência à temperatura, estado de oxidação das espécies, etc.

2.2 – Métodos de extração de compostos orgânicos

O trabalho do analista químico inicia-se normalmente pela inspeção visual do artefacto, de forma a decidir qual o método de preparação de amostra mais adequado. Nesta revisão bibliográfica apresentar-se-ão algumas das técnicas mais utilizadas na extração de compostos orgânicos de amostras cerâmicas: aparelho de Soxhlet, ultrassons, micro-ondas e cromatografia *flash*.

- **Aparelho de Soxhlet:** O aparelho de Soxhlet (Figura 2.1) é um instrumento de vidro muito utilizado em química analítica, inventado pelo químico alemão, Franz Ritter von Soxhlet. Este aparelho é vulgarmente aplicado na extração de compostos orgânicos presentes em amostras sólidas. A amostra de cerâmica previamente pulverizada é colocada num cartucho introduzido no Soxhlet. Este é acoplado na parte inferior a um balão de fundo redondo contendo solvente e na parte superior a um condensador alimentado por água da rede pública. Depois de montado o sistema, o balão contendo solvente é aquecido com o auxílio de uma manta de aquecimento com agitação magnética. O aumento de temperatura provoca a vaporização do solvente que condensa ao atingir o condensador, a uma temperatura inferior. Neste processo, o solvente puro goteja desde o condensador para o Soxhlet onde se encontra alojado o cartucho com a amostra pulverizada, iniciando-se desta forma a extração dos materiais orgânicos lá contidos (Figura 2.1.a e 2.1.b). Quando o nível de solvente dentro da câmara é suficientemente elevado, atinge o sifão que promove o retorno do solvente do Soxhlet para o balão de fundo redondo, recomeçando um novo ciclo de extração.

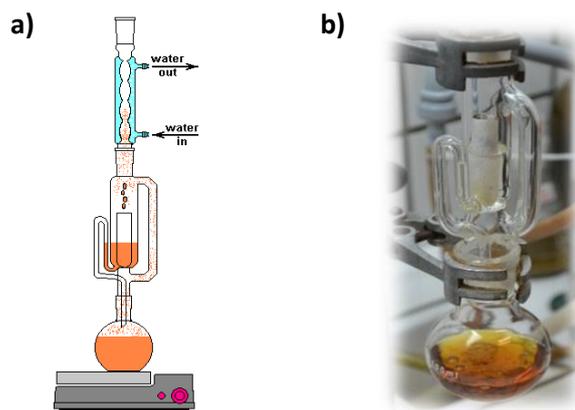


Figura 2.1 – a) Montagem para extração em aparelho Soxhlet⁷⁰, b) Exemplo de uma extração com MeOH.

- **Ultrassons:** Uma extração ultrassônica típica permite a remoção e recuperação de analitos orgânicos a partir de uma matriz sólida permeável, utilizando um solvente que é energizado pela emissão de sons a elevadas frequências, superiores ao que o ouvido humano consegue distinguir. Para efetuar uma extração usando este método é necessário inserir a amostra pulverizada no interior de um cartucho de modo a esta ficar armazenada na sua base. De seguida coloca-se o cartucho num gobelet que contenha um solvente de polaridade apropriada e insere-se no banho de ultrassons. As extrações realizadas por este processo são bastante mais rápidas que aquelas efetuadas usando um aparelho Soxhlet. Contudo, o elevado aumento de energia do solvente em contacto com a amostra provoca a formação de bolhas de cavitação no interior das quais se atingem temperaturas e pressões extremamente elevadas⁷¹. Tendo em consideração as características químicas de alguns dos compostos detetados, percebe-se este não ser um processo de extração a usar indiscriminadamente para todas as amostras.

- **Micro-ondas:** Neste método, recorre-se à utilização de vasos de teflon ou quartzo que se fecham hermeticamente após a introdução da amostra (sólida ou líquida) e do solvente de extração (que terá a polaridade pretendida). Podem ser usados simultaneamente vários vasos que se posicionam num rotor (o valor final varia consoante o aparelho), colocando-se dentro de uma caixa fortificada chamada de cavidade de micro-ondas. Já com o aparelho fechado, o analista pode optar por um programa de temperaturas que varia no tempo de acordo com a programação

pretendida. A temperatura desejada é imposta pela libertação de radiação eletromagnética na região dos micro-ondas diretamente para os vasos que se encontram num processo giratório devido ao rotor. Ao aquecerem devido à brusca “injeção” de energia, é usual que os níveis de pressão também aumentem gradualmente, podendo levar a perdas de amostra. Todavia, os aparelhos e vasos mais recentes possuem sistemas capazes de aliviarem as pressões sempre que necessário. No final da extração, o químico deverá retirar cuidadosamente os vasos do aparelho e limpá-los meticulosamente⁷². Este sistema extrator apresenta vantagens relativamente a qualquer outro pela velocidade em que realiza corretamente este processo.

- **Cromatografia *flash***: Esta técnica não visa a extração dos compostos orgânicos de matrizes sólidas mas sim realizar uma separação prévia de misturas complexas de compostos orgânicos. Por esse motivo esta deverá usar-se complementarmente a técnicas de extração, como as descritas anteriormente.

Uma grande parte dos artefactos para análise química apresentam-se visualmente limpos de material orgânico, sendo detetadas apenas quantidades residuais de compostos. Nestes casos não se justifica a aplicação de procedimentos preparativos como a cromatografia *flash*. Todavia, algumas amostras podem exibir uma coloração bastante intensa característica de extensos depósitos de material orgânico. Nesses casos, uma simples extração por Soxhlet ou ultrassons poderá originar extratos orgânicos extraordinariamente ricos e concentrados, dificultando uma subsequente separação cromatográfica por deficiente capacidade de resolução da mistura. Nestes casos é imperativo efetuar-se uma separação prévia utilizando-se uma coluna para cromatografia *flash* (Figura 2.2). Esta coluna será constituída por uma fase estacionária de sílica, um chumaço de algodão que ficará abaixo das partículas estacionárias, impedindo-as de saírem da coluna e um filme adsorvente imediatamente acima. No topo da coluna dever-se-á colocar um solvente que nunca deverá ficar num nível abaixo do filme adsorvente para não comprometer a fase estacionária. Antes da introdução da amostra deve-se “lavar” a coluna duas ou três vezes com um eluente. Apenas se deve adicionar a amostra quando este está muito perto do filme adsorvente, o que permite o alargamento das bandas a serem eluídas. Após a amostra eluir e penetrar o filme de adsorvente pode-se colocar continuamente os eluentes com as polaridades pretendidas

(tipicamente diclorometano para os compostos apolares e metanol para os compostos mais polares) e esperar a saída dos extratos de compostos orgânicos devidamente separados.



Figura 2.2 – Diferentes frações orgânicas após a realização de uma cromatografia “flash”.

2.3 – Métodos de análise

A utilização de técnicas de extração de compostos orgânicos precede o passo seguinte de quantificação. Neste trabalho apontam-se algumas das técnicas analíticas mais usadas na quantificação de compostos orgânicos, como a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a espectroscopia de Raman e as técnicas cromatográficas hifenadas como as cromatografias líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massa (respetivamente LC-MS e GC-MS).

- **FTIR:** A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, por vezes designada simplificada como infravermelho (Figura 2.3, é uma espectroscopia de absorção na região do infravermelho do espectro eletromagnético que é muito utilizada na deteção de grupos funcionais de compostos orgânicos presentes em artefactos arqueológicos, por permitir efetuar a análise de materiais orgânicos inseridos na matriz cerâmica. Esta espectroscopia baseia-se no facto das ligações químicas das substâncias possuírem frequências de vibrações específicas, correspondendo a níveis de energia das moléculas (níveis vibracionais). Se uma molécula receber radiação com a mesma energia dessas vibrações, então a luz é absorvida, e para que uma vibração apareça no espectro de IV, uma molécula precisa de sofrer uma variação no seu momento dipolar durante

essa vibração⁷³. Resumindo, esta técnica de IV, recolhe informações sobre os movimentos rotacionais e vibracionais de uma molécula dando origem a um espectro que para além de informar sobre os grupos funcionais dos compostos orgânicos, proporciona também uma “impressão digital única”.



Figura 2.3 – Aparelho de FTIR utilizado neste trabalho.

- **Espetroscopia de Raman:** Trata-se de uma técnica que usa uma fonte monocromática de luz que é dispersa ao atingir a amostra, gerando luz de mesma energia ou de energia diferente da incidente (efeito de *Raman*). No primeiro caso, o chamado espalhamento elástico não é importante, contudo com o segundo (espalhamento inelástico) é possível obter muitas informações importantes sobre a composição química da amostra. Essa diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que os átomos presentes na área estudada estão a vibrar, e a frequência de vibração permite saber como os átomos estão ligados, ter informação sobre a geometria molecular e sobre a forma como as espécies químicas presentes interagem com o ambiente. Cada composto detetado fornece um espectro que funciona como a sua impressão digital, permitindo assim a sua identificação inequívoca⁷⁴. Tal como o FTIR, o *Raman* é usado em arqueometria como primeiro método de deteção de compostos orgânicos. Caso os resultados sejam positivos, dever-se-á complementar a análise com métodos de quantificação mais precisos, como os cromatográficos.

- **Cromatografia:** Inventadas pela primeira vez em 1900 por *Mikhail Semenovitch*, um botânico russo, as técnicas cromatográficas vieram revolucionar o mundo científico pela sua eficácia na separação física de componentes de misturas. Desde a sua criação, estas

técnicas têm sofrido enormes e variadas modificações, principalmente devido ao desenvolvimento das tecnologias, contudo a sua base teórica mantém-se inalterada. Em todas as separações, é obrigatória a existência de uma amostra (mistura) que se pretende separar, uma fase móvel onde vai estar dissolvida a amostra, e uma fase estacionária que vai interagir com as duas anteriores. No caso das cromatografias líquida e gasosa existem algumas características que lhes são comuns: injetor (local onde se introduz a amostra), coluna (local onde se insere a fase estacionária, e se dá a separação física da mistura), detetor (local onde os fragmentos que foram separados são detetados).

Na **cromatografia gasosa** (Figura 2.4a) a fase móvel neste caso é um gás inerte (hélio, nitrogénio, árgon) que não reage com a amostra ou fase estacionária, sendo por isso muitas vezes chamado apenas por “gás de arraste”. Assim, a amostra ao ser empurrada para a fase estacionária vai ser separada de acordo com as possíveis afinidades entre ambos e mais tarde detetados pelo detetor do equipamento. Dada a necessidade de volatilização dos compostos para a sua introdução na coluna, esta técnica mostra-se inadequada para a análise de compostos pouco voláteis.

A **cromatografia líquida** (Figura 2.4b) de alta eficiência apresenta como vantagem a utilização de diferentes solventes como fase móvel, permitindo variar as suas proporções relativas de modo a otimizar a separação. Após a separação, os compostos são detetados pelo detetor do equipamento e os resultados transmitidos para um computador ligado ao sistema.

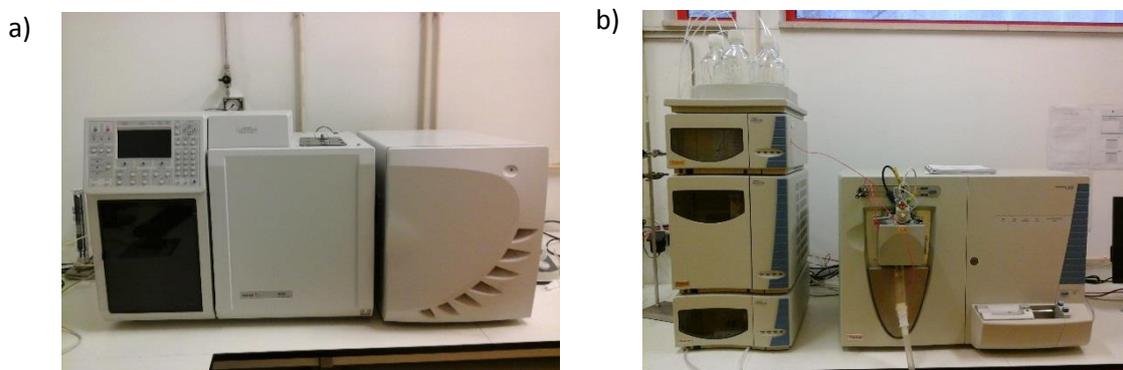


Figura 2.4 – a) Cromatógrafo gasoso com espectrómetro de massa, Varian 4000 e b) Cromatógrafo líquido com espectrómetro de massa, Thermo LXQ.

- **Espetrometria de Massa:** Atualmente é comum recorrer-se à utilização da espectrometria de massa acoplada a técnicas cromatográficas combinando assim a capacidade de separação de física de misturas com a obtenção dos espectros de massa de cada um dos fragmentos originados. Esta combinação é considerada uma mais-valia nesta área por permitir atingir limites de deteção (Ldd) muito baixos. De facto, o Ldd corresponde à concentração mínima do analito necessária para a sua deteção, sendo este parâmetro extremamente importante neste tipo de estudos pela reduzida quantidade de fragmento cerâmico muitas vezes disponibilizado para análise, resultando em quantidades residuais de compostos orgânicos para análise. Uma outra característica que torna imprescindível a utilização de um detetor de massa em trabalhos arqueométricos é a sua possibilidade de utilização de livrarias de espectros de massa, tornando mais fácil a identificação de compostos desconhecidos.

Trata-se de uma técnica espectroscópica qualitativa e quantitativa que permite obter informações relacionadas com a massa molecular de um composto, a sua fórmula molecular, detalhes estruturais da molécula e o seu padrão de fragmentação. Inicialmente é necessário introduzir a amostra no MS (normalmente através do injetor de uma técnica cromatográfica, sendo portanto este um GC-MS ou LC-MS), e ioniza-la ou fragmenta-la consoante a técnica cromatográfica acoplada. Para ionizar/fragmentar a amostra existem diferentes métodos, sendo EI (impacto eletrónico), CI (Ionização química), MALDI (Ionização em matriz assistida por laser de desorção) ou ESI (Ionização por eletrospray) conhecidos exemplos dessas fontes, sendo que todos apresentam variações (mesmo que pequenas) nos seus funcionamentos, e à exceção do último, todos são realizados a baixas pressões, enquanto ESI pode ser manuseado a pressão atmosférica. Assim, a molécula original é dividida em pequenos fragmentos ocorrendo a formação de um radical e um ião com carga elétrica que mais tarde passam pelos analisadores de deflexão magnética, quadrupólos, de armadilha de iões ou Time-Of-Flight (TOF) e separados de acordo com as suas características como tamanho ou carga. Os resultados são enviados para um computador anexo ao aparelho. É também possível aplicar-se o Tandem MS/MS. Esta técnica consiste em aplicar espectrometria de massa em duas fases: na primeira ionização são gerados vários iões, isolando-se e estabilizando-se um ião de interesse (seleção de massa, ião precursor) que depois será submetido a nova ionização, obtendo-se um espectro da fragmentação desse ião em particular.

2.4 – Métodos de análise elementar

Embora o cerne desta revisão bibliográfica esteja intimamente ligada à análise de compostos orgânicos em artefactos cerâmicos arqueológicos, é também importante referir que existem técnicas químicas adequadas à análise de outros materiais que não os compostos orgânicos presentes em artefactos cerâmicos. Por exemplo, os métodos seguintes são aplicados no estudo da composição de materiais inorgânicos.

- **Espetroscopia de absorção atômica:** É uma técnica espectroscópica de absorção de radiação na zona do visível e do ultravioleta por átomos neutros no estado gasoso. Existem vários tipos de espectrómetros de absorção atômico, e apesar de todos eles apresentarem as suas próprias características que se traduzem em fortes variações de sensibilidade, limites de deteção e seletividade da técnica, e consequentemente no preço, todos eles se baseiam no mesmo princípio teórico de funcionamento. Inicialmente atomizam-se as amostras (líquidas ou sólidas), fazendo-se incidir sobre os átomos neutros radiação na zona do visível ou UV, com a frequência característica do elemento que se pretende estudar, de forma a esses átomos absorverem a radiação fornecida. Ao absorver a radiação ocorre a risca de ressonância, ou seja, os átomos passam do estado fundamental para o estado excitado de mais baixa energia. Sabendo que a energia de absorção é diretamente proporcional à concentração do analito, pode determinar-se a sua concentração pelo método de curva de calibração ou da adição de padrão.

- **Espetroscopia de emissão atômica:** A técnica de espectroscopia de emissão atômica é um importante método de quantificação multielementar. Neste método utiliza-se a intensidade de luz emitida por uma chama ou plasma acoplado indutivamente. O primeiro passo corresponde à introdução e volatilização de amostra. Ainda com ajuda de chama ou de plasma, os elementos da amostra são excitados a um comprimento de onda previamente estabelecido, emitindo fotões quando retornam ao seu estado fundamental. Esta radiação apresenta uma intensidade que é diretamente proporcional à concentração e número de átomos do elemento em questão⁷⁵.

Para além destas técnicas existem também outras técnicas para análise da fração inorgânica de matrizes arqueológicas como a difração de raio-X (XRD), a espectroscopia fotoeletrónica de raios-X (XPS), a espectroscopia eletrónica de Auger (AES) e a espectroscopia fotoeletrónica de ultra-violeta (UPS).

- **Difração de Raio-X (XRD):** esta técnica permite avaliar o modo de difração de ondas pela estrutura cristalina, cujo comprimento de onda é da mesma ordem de grandeza das distâncias interatómicas. Assim, o sinal é medido por um cristalógrafo que capta os feixes de raio-X difratados em diferentes ângulos. Esta técnica é capaz de ceder informações como as fases cristalinas, ou ligações químicas de uma amostra, conseguindo-se posteriormente proceder à sua identificação e de toda a composição da amostra. É uma técnica vastamente aplicada no estudo de materiais cerâmicos, na determinação das pastas de fabrico, temperaturas de cozedura ou cristalinidade mineralógica. É no entanto aplicável a todo o tipo de amostras que se apresentem cristalinas (ou pelo menos, não 100% amorfas), como por exemplo, cerâmicas, fósseis, vidros, arte entre outros. É uma técnica não destrutiva e não requer qualquer tipo de tratamento de amostra⁷⁶.

- **XPS, AES e UPS:** são métodos espectroscópicos eletrónicos de análise de superfícies, sendo de utilização similar dado funcionarem com princípios teoricamente próximos. São técnicas que provocam a excitação, a emissão e a deteção posterior de um eletrão com uma determinada energia de ligação, e apenas diferem na intensidade de energia que impõem sobre o eletrão a excitar (raio-x forte, soft raio-x e UV, respetivamente). São muito utilizadas em arqueometria na determinação de estados de oxidação, na obtenção de percentagens atómicas e na identificação elementar⁷⁶. Tal como em XRD, estas técnicas não são destrutivas, nem requerem qualquer tipo de tratamento das amostras.

2.5 – Aplicação do conceito de traçador molecular

Em muitos casos não é suficiente para identificar a matriz orgânica original a simples detecção e a identificação dos vários compostos orgânicos presentes. De facto, é necessário relacioná-los com uma possível fonte o que pode não ser imediato devido à elevada complexidade das misturas orgânicas habitualmente detetadas. Apesar das pequenas quantidades de cerâmica analisadas, são normalmente detetados várias dezenas de compostos moleculares orgânicos que muitas vezes não conferem ao analista informações determinantes para o objetivo do seu trabalho. De facto, uma parte dos compostos orgânicos detetados é redundante devendo-se este facto à existência destes compostos comuns a uma grande variedade de matrizes orgânicas, não sendo por isso exclusivos de um único produto, pelo que a sua detecção, por si, não é inteiramente informativa. Também é comum a detecção de compostos conhecidos como contaminações, como por exemplo a identificação de siloxanos provenientes da fase estacionária da coluna do cromatógrafo gasoso, ou de ftalatos originários de materiais plásticos ou borrachas, entre outros.

Os chamados **traçadores moleculares** são idealmente compostos característicos de uma fonte única ou com um pequeno leque possível de origens (Tabela 2.1). Estes traçadores moleculares são conhecidos quer por terem já sido detetados em matrizes orgânicas contemporâneas, conhecendo-se desta forma a sua origem, quer estudando os mecanismos de degradação de compostos orgânicos de forma a se relacionar os compostos detetados com uma possível matriz orgânica que lhes terá dado origem⁷⁷. Estes conhecimentos podem ser complementados efetuando análises químicas a materiais orgânicos diferentes matrizes, de forma a inferir-se da sua composição. É graças à combinação de todos estes procedimentos e do conhecimento das diferentes combinações entre estes compostos que se estabelecem ligações entre os resultados das análises e certos produtos, como o mel, vinho, leite, preparados piscícolas, resinas, entre outros (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 - Exemplos de traçadores moleculares de alguns produtos comercializados na antiguidade.

Produtos	Traçadores moleculares
Vinho	Ácidos tartárico e siríngico
Preparados Píscicolas	Fitol e ácido fitânico
Mel/Cera de abelha	5-hidroximetilfurfural – ésteres metilados
Azeite/Azeitonas	Ácidos oleico e linoleico
Queima de biomassa vegetal	Levoglucosano e ácido abiético
Óleos vegetais	Limoneno, linalol e mirceno

Tabela 2.2 – Lista dos principais compostos orgânicos detetados nas diferentes matrizes arqueológicas.

Materiais cerâmicos	Artes e Tecidos	Estruturas Ósseas
Compostos terpénicos	Pigmentos	Aminoácidos
Lípidos animais	Corantes	Ácidos Orgânicos
Lípidos vegetais	Tintas	Lípidos
Aminoácidos		
Hidratos de Carbono		
Ácidos Orgânicos		
Materiais resinosos		

2.5.1 - Materiais orgânicos e alguns processos de degradação

- **Vinho:** Este foi um dos produtos mais comercializados na antiguidade, abastecendo diariamente as grandes elites populacionais, os cidadãos mais humildes ou mesmo legiões de soldados¹⁶. A fermentação intencional de hidratos de carbono em álcool (etanol) foi uma das maiores inovações que marcaram a transição das sociedades paleolíticas para neolíticas, tendo sido inclusivamente um dos fatores que promoveu o sedentarismo, e o desenvolvimento e incremento da produção de cerâmicas^{78,79}. Algumas evidências químicas suportam o facto da presença de resíduos de vinho poder

ser confirmada pela detecção de marcadores orgânicos característicos deste, preservados nas matrizes cerâmicas. Estes compostos incluem o ácido tartárico, uma molécula muito abundante em vinho^{26,79}, e compostos resinosos adicionados unicamente para a preservação de sabor, que não são no entanto exclusivos deste produto, acabando por não comprovar irrefutavelmente a sua existência^{26,80,81}. Verifica-se que o ácido tartárico, uma molécula muito solúvel em água, está muito presente em vegetais e frutas como a uva, e os compostos resinosos⁸¹, estão normalmente relacionados com compostos terpênicos característicos de pinheiros, como o α -pineno, α -muoroleno ou copaeno^{26,80}.

Um melhor indicador para a formação e presença de vinho é a malvidina⁷. A malvidina é uma antocianina que dá origem à cor avermelhada das uvas e vinho tinto⁸². É um composto bastante estável que polimeriza ao longo tempo, levando a um gradual escurecimento da sua tonalidade, que também depende do pH da solução. A sua solubilidade em água diminuiu drasticamente à medida que vai polimerizando, sendo por isso notável a persistência e durabilidade de manchas criadas por este produto. Outra característica da malvidina é polimerizar quando em ambiente alcalino libertando ácido sirínico (figura 2.5). Assim, surge também o ácido sirínico enquanto traçador molecular de vinho^{7,83}.

Para além desta seleção de compostos existem alguns outros que apesar de não serem tão seletivos para o vinho, são-lhes também característicos. Por exemplo o siringaldeído e o ácido succínico, um dos ácidos mais comuns encontrados no vinho que é derivado da metabolização de nitrogénio por leveduras durante a fermentação (fermentação de açúcares) (Figura 2.6)²⁶. Também os ácidos pirúvico, acético, málico, cítrico, ascórbico, láctico, entre outros²⁴.

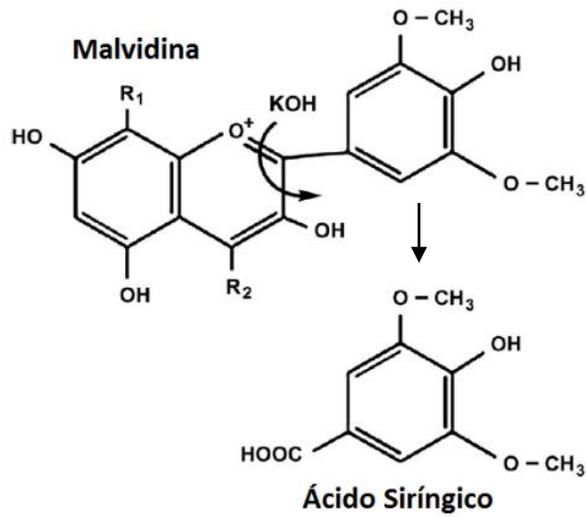


Figura 2.5 - Polimerização de uma molécula de malvidina com a consequente formação de ácido siríngico⁷.

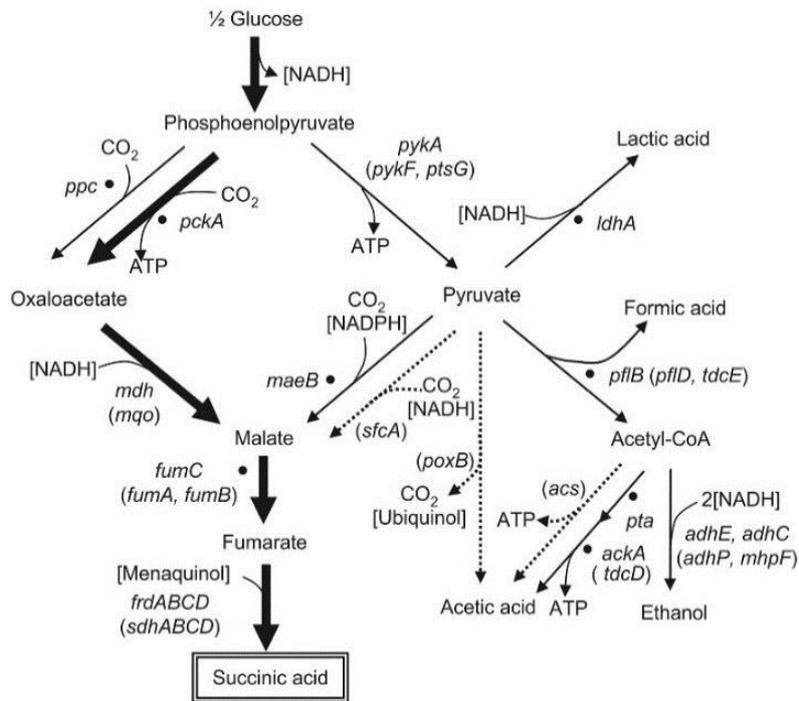


Figura 2.6 – Formação de ácido succínico (entre outros intermediários) durante o processo de fermentação⁸⁴.

- **Preparados piscícolas:** Tal como ainda hoje em dia acontece, em tempos ancestrais era importante o consumo de preparados de peixe, sendo necessário o seu transporte para populações distantes das zonas costeiras⁸⁵. Nesse período destacava-se o comércio de uma mistela em forma de pasta ou líquida, que consistia na mistura entre preparados de peixe e outros compostos. Desses preparados, realçava-se a produção de *alec*, *muria* e principalmente *garum*⁶⁹. Sendo considerados produtos de luxo, as suas preparações eram feitas de forma similar, sendo o *garum* uma mistela de sangue, vísceras, plantas, algas e várias espécies de peixes de pequeno porte esmagados, que seriam deixados de salmoura por alguns meses ou aquecidos artificialmente (anexo 1)^{69,86}. Estes produtos ricos eram então utilizados como pasta para condimentar alimentos. Transportados maioritariamente em contentores cerâmicos, estes preparados podem, apesar de toda a deterioração provocada ao longo dos anos, ser detetados analiticamente e assim quantificados⁸⁶.

Os principais constituintes destes preparados piscícolas são aminoácidos⁸⁷ e ácidos gordos (saturados e insaturados)^{88,89}. Como se sabe, os peixes apresentam tal como qualquer animal, uma constituição proteica que se degrada muito rapidamente. Desta contínua degradação surgem então os constituintes monoméricos mais básicos, os aminoácidos, sendo a glicina, alanina, glutamina, tirosina, serina e asparagina os mais comuns⁸⁷. Os ácidos gordos insaturados, principalmente ómega 3, são também característicos de peixes e óleos de peixe⁹⁰. No entanto, apenas a deteção de aminoácidos e lípidos como o colesterol (esteróis), ou produtos da inevitável hidrólise de triacilglicerídeos (ácidos gordos livres e glicerol) (Figura 2.7), não comprovam a existência de peixe. É de relembrar que os aminoácidos são compostos orgânicos que de certa forma são pouco específicos, uma vez que podem indicar uma enorme variedade de origens, tanto animais como vegetais, enquanto os lípidos são um grupo de compostos orgânicos onde se incluem óleos, gorduras e ceras, todos eles insolúveis em água⁹¹. No caso de *garum*, o melhor traçador molecular indicador da sua presença é o fitol⁹². O fitol é um diterpeno alcoólico de cadeia ramificada que está presente na constituição da clorofila, que por conseguinte é um pigmento verde que está obrigatoriamente impregnada em algas e plantas utilizadas na receita de *garum*^{85,92}. Uma segunda característica do fitol, é que este pode ser oxidado dando origem ao ácido

fitânico, um ácido gordo de cadeia ramificada que só por si, já existe naturalmente em óleos de peixes^{93,94} (Figura 2.8).

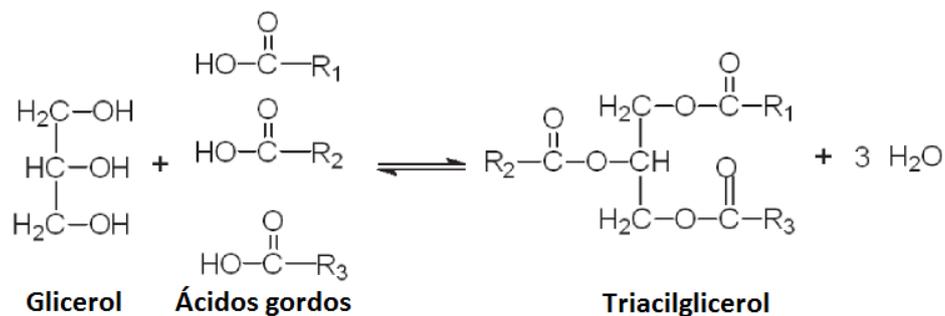


Figura 2.7 – Hidrolise de triacilglicerídeos em 3 ácidos gordos livres e uma molécula de glicerol⁹⁴.

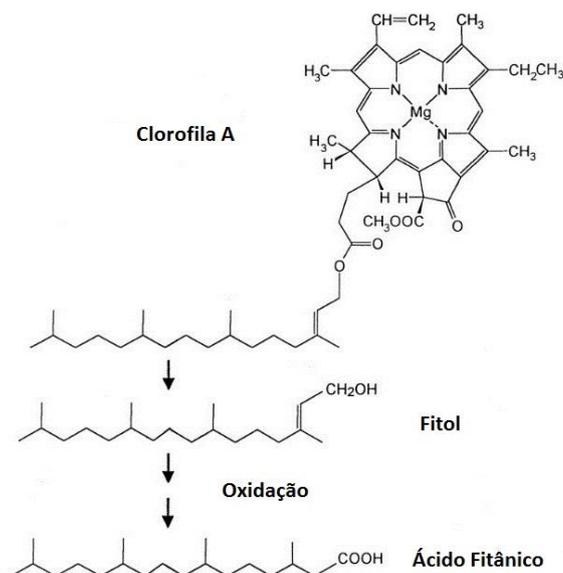


Figura 2.8 – Formação de ácido fitânico a partir de uma molécula de pigmento de clorofila A⁹².

- **Mel e cera de abelha:** O mel é um produto natural utilizado desde a antiguidade não só como edulcorante, mas também para dar sabor ou mesmo condimentar outros alimentos, como *garum*, carnes, cerveja e vinho²³. No contexto de uma análise química, é relativamente fácil identificar resíduos de mel num fragmento cerâmico ancestral

devido à enorme quantidade de hidratos de carbono (açúcares) aprisionados entre camadas de argila (figura 2.9)^{23,95}. Entre outros compostos como aminoácidos ou compostos de origem vegetal, os açúcares são os que mais se destacam apresentando-se numa enorme variedade e com intensidades muito mais elevadas que os restantes compostos detetados⁹⁵.

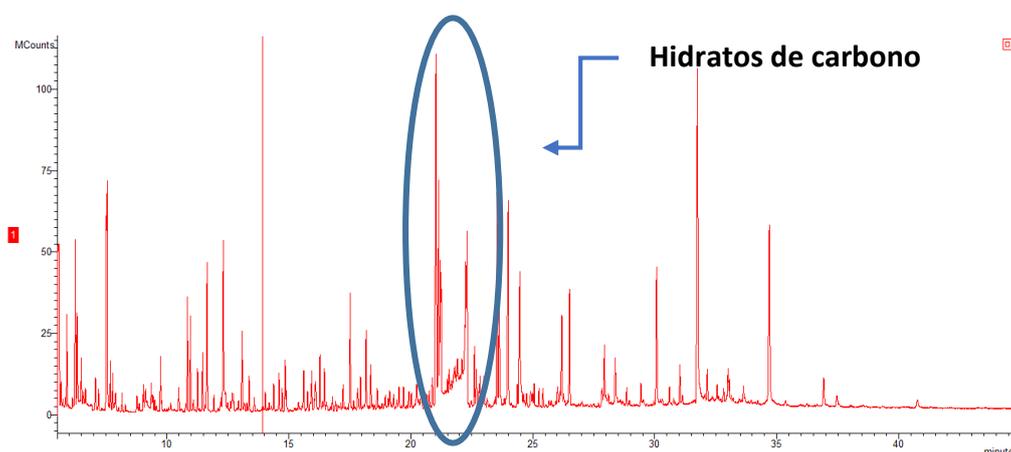


Figura 2.9 – Cromatograma de um extrato orgânico de um fragmento de pote meleiro onde se encontram evidentes as intensidades elevadas dos hidratos de carbono.

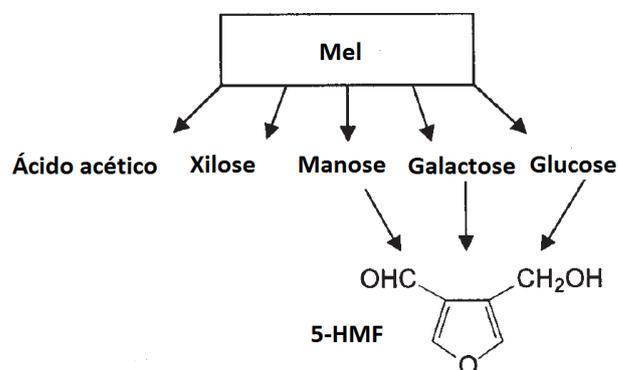


Figura 2.10 – Esquema da formação do 5-hidroximetilfurfural⁹⁶.

Em adição a estes compostos, surge o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) (Figura 2.10⁹⁶), um derivado de furano, muito tóxico que surge da degradação de hexoses como a glucose, galactose e manose⁹⁷. Estas degradam-se em frutose quando expostas a condições de elevadas temperaturas, tendendo a sofrer uma desidratação e originar a molécula de HMF (Figura 2.11)⁹⁸.

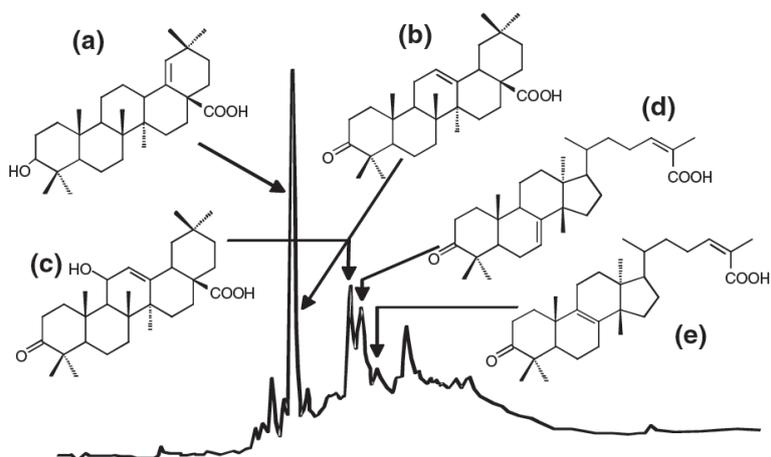


Figura 2.12 – Cromatograma relativo a materiais recolhidos numa múmia egípcia do período ptolomaico, onde foi detetada cera de abelha juntamente com quantidades residuais de compostos vegetais ¹⁰².

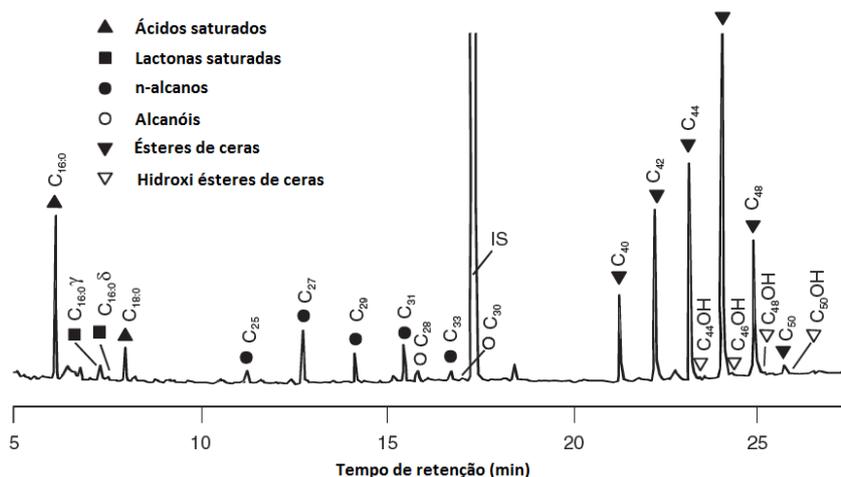


Figura 2.13 – Cromatograma relativo a materiais recolhidos numa múmia egípcia do período ptolomaico, onde foram detetados compostos característicos de cera de abelha ¹⁰².

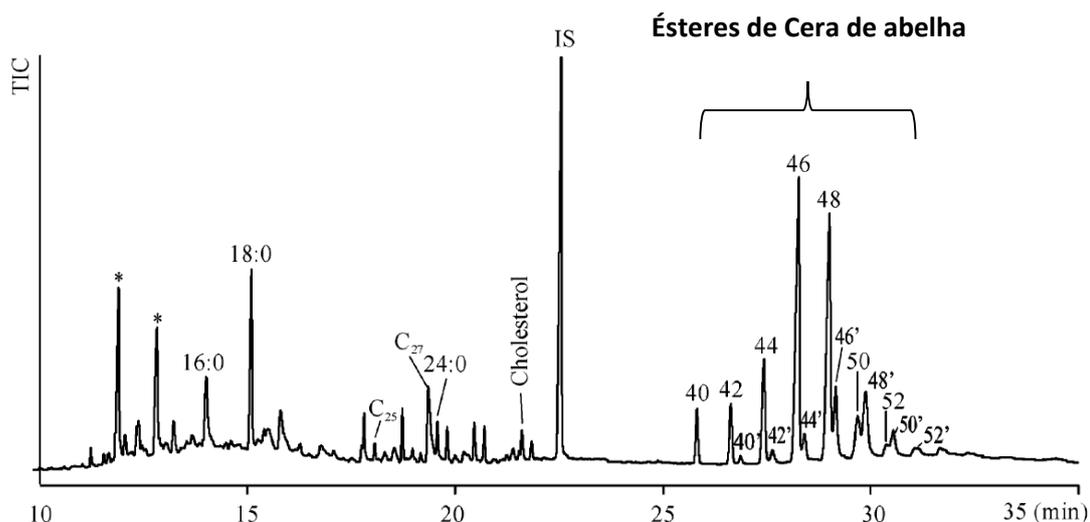


Figura 2.14 – Cromatograma de um copo Etrusco do século 8 a.C, onde foram detetados compostos pertencentes à cera de abelha ¹⁰⁵.

A sua presença em artefactos arqueológicos pode ser detetada pela comparação com cera de abelha contemporânea que apresenta na sua constituição *n*-alcanos saturados e insaturados, monoésteres, diésteres, hidroxiésteres, ácidos gordos de cadeia longa, e em menor quantidade outros constituintes como flavonoides¹⁰⁰. Os monoésteres saturados são os lípidos mais importantes para identificação de cera de abelha, que consistem em álcoois de cadeia longa com número de carbonos pares (C₂₄ ao C₃₆), que sofrem esterificações pelo ácido palmítico (C_{16:0})¹⁰⁵. Outros compostos significantes como os monoésteres de carbono par, derivam dos ácidos palmitoleico (C_{16:1}) e oleico (C_{18:1}). Os ácidos gordos e hidroxiésteres derivam da hidroxilação do éster palmitato¹⁰⁵ (Figura 2.15).

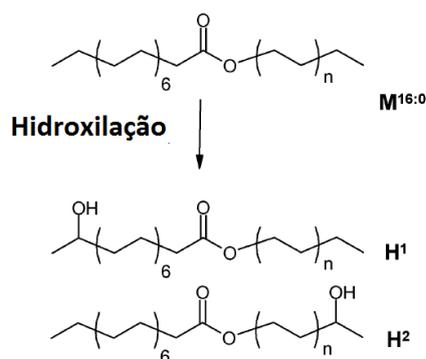


Figura 2.15 - Hidroxilação de ésteres de palmitato com formação de hidroxiésteres¹⁰⁵

Apesar de serem compostos estáveis, é praticamente inevitável que a composição química de cera de abelha encontrada em artefactos arqueológicos se apresente alterada relativamente à sua estrutura original (Figura 2.16)¹⁰⁶. Esta pode ser caracterizada pela presença de monoésteres saturados com número de carbonos pares (C₄₀ ao C₅₂) que derivam do ácido palmítico, n-alcenos de cadeia longa com número de carbonos ímpares (C₂₁ ao C₃₃), e finalmente, ácidos gordos saturados de cadeia longa com número de carbonos pares (C₂₂ ao C₃₄)^{100,105,107}.

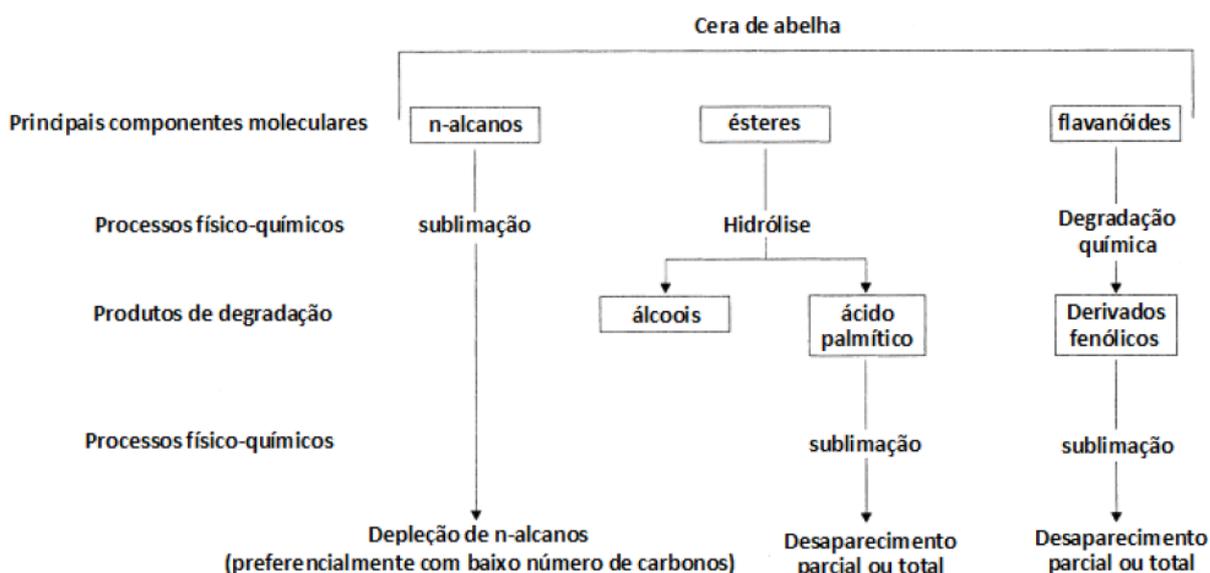


Figura 2.16 – Processos de degradação dos principais constituintes orgânicos de cera de abelha¹⁰⁶.

- **Queima de biomassa vegetal:** A queima de materiais celulósicos como a madeira, ramos ou folhagens, liberta para a atmosfera compostos químicos estáveis à temperatura ambiente muito característicos²³. A revelação de marcadores orgânicos que queima de biomassa vegetal são então, realmente importante, uma vez que estes encobrem sempre um processo para além do de queima de biomassa²³. Ou seja, estes são marcadores que estarão incluídos em amostras de *garum*, uma vez que o peixe teria de ser cozinhado após a salmoura⁸⁶, amostras de mel, uma vez que à margem do que ainda acontece hoje em dia, se dava a introdução de fumos nas colmeias para se retirar as abelhas²², entre outros processos. Assim, com a compreensão da importância deste

fenómeno, vem a necessidade de conhecer os seus traçadores moleculares mais característicos. É proposto o levoglucosano, um derivado de monossacarídeo como um indicador específico da queima de celulose em emissões de queima de biomassa¹⁰⁸. A celulose é uma molécula de longa cadeia polimérica linear, constituída por 7000 a 12000 monómeros de D-glucose associados em fibrilas elementares, e apresenta-se como o principal elemento de manutenção estrutural dos materiais que a constituem (madeira, ramos, etc.)¹⁰⁸. Quando se dá a combustão destes materiais ocorre a clivagem de ligações na molécula de celulose com formação de açúcares anidro e outros compostos voláteis. Estes, ao pirolisarem vão originar o 1-6 anidrido da glucose, também chamado de levoglucosano¹⁰⁹ (Figura 2.17).

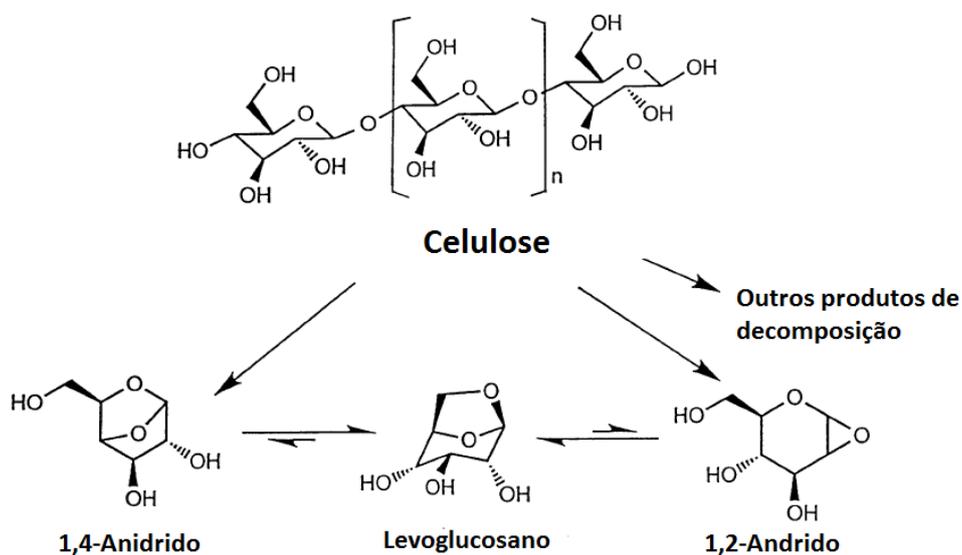


Figura 2.17: Produtos da pirólise de celulose¹⁰⁸.

O ácido abiético surge também como um componente de resinas de origem *Pinaceae*²⁶. Durante o processo de aquecimento, o ácido abiético (AA) pode ser convertido em ácido desidroabiético (DSA) pelo processo de desidrogenação¹¹⁰. Uma série de outras transformações podem produzir outros compostos orgânicos intermediários quando um tratamento termal é permanente e mais intenso (Figura 2.18)²⁶. Apesar da reação principal corresponder à desidrogenação de AA a DSA, uma descarboxilação de DSA pode produzir desidrobietina. Aumentando a aromatização de desidrobietina assim como a descarboxilação de DSA, gera-se norabietamene^{26.110}. Norabietamene pode ser desidrogenado a tetrahidroreteno e reteno (formado predominantemente quando o processo é realizado a muito altas temperaturas)^{26.110}.

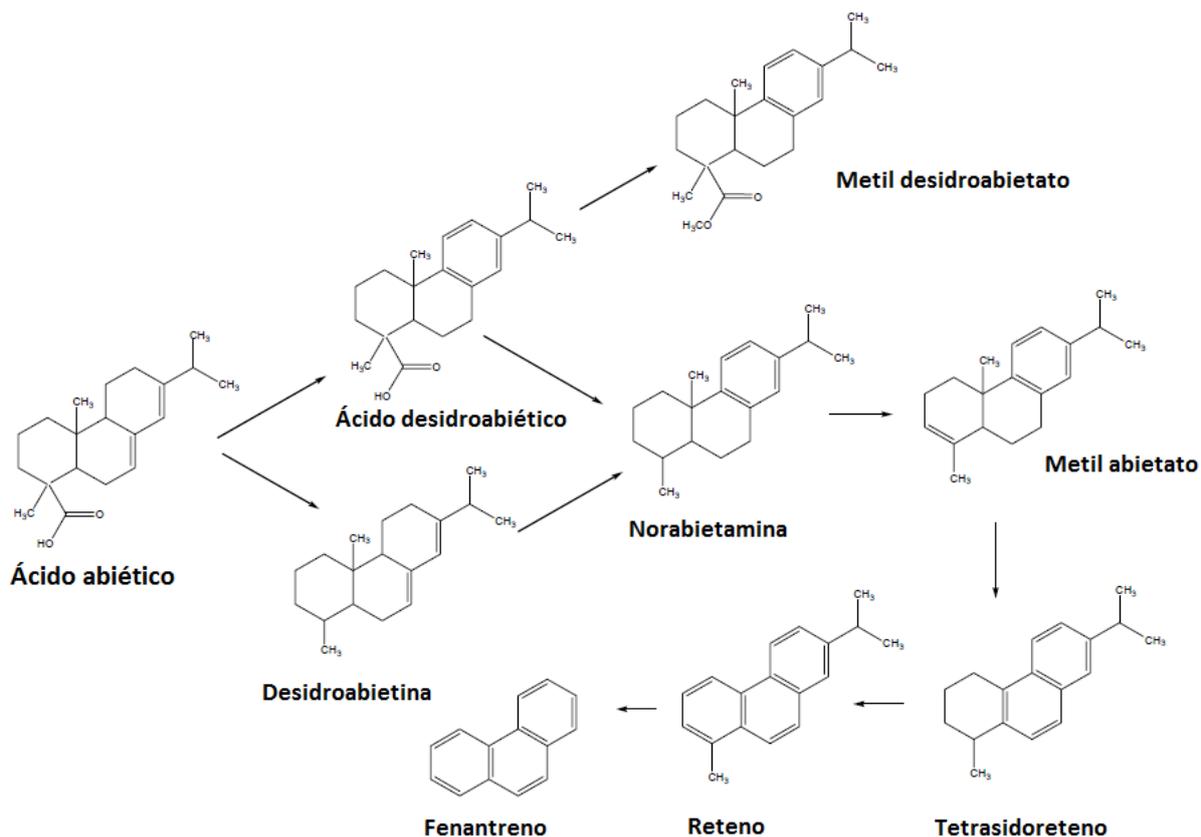


Figura 2.18 – Reações de transformação do ácido abiético²⁶.

- **Azeite e Azeitonas:** A oliveira, *olea europaea*, é uma planta característica da bacia mediterrânea e de partes da Ásia menor, produzindo como fruto as azeitonas. Existem referências a oliveiras que remontam à antiguidade, datadas dos tempos Bíblicos e Romanos, ou mesmo da mitologia Grega. Historicamente, os produtos da *olea europaea* eram caracteristicamente usados como afrodisíacos, laxantes, tónicos, sedativos além de serem alimentos nutritivos¹¹¹. Dos seus frutos extrai-se o azeite, um dos principais constituintes da atual dieta mediterrânea¹¹². Considerado um produto muito rico, o comércio de azeite ou azeitonas, era apenas estabelecido entre populações pertencentes às elites da sociedade²⁴. A sua presença em artefactos arqueológicos cerâmicos é detetada pelo facto de esta apresentar na sua constituição um conjunto maioritário de compostos como: ácidos gordos saturados e insaturados, com muito especial destaque para o ácido oleico, e também linoleico e palmítico, compostos fenólicos e o esqualeno¹¹³. Os ácidos gordos provenientes da degradação de triacilglicerídeos (Figura 2.19) são traçadores destes produtos, não pela sua presença, mas pela intensidade em que se apresentam, uma vez que o ácido oleico, um ácido gordo monoinsaturado corresponde a cerca de 72% da constituição do azeite¹¹⁴.

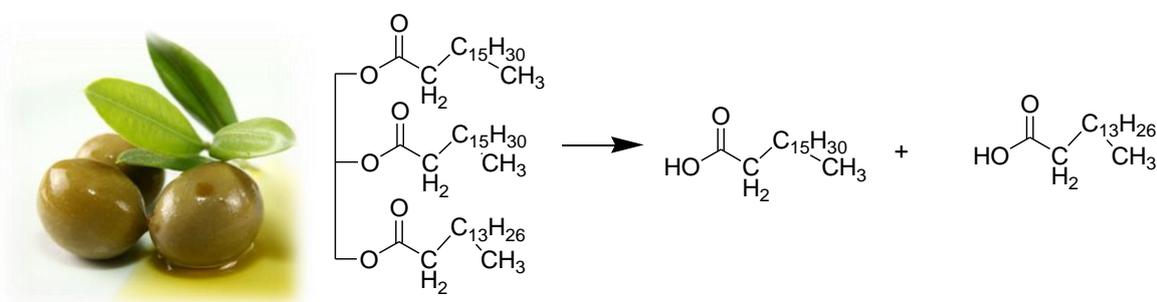


Figura 2.19 - Formação de ácidos gordos C16:0 e C18:0 pela hidrólise de triglicéridos presentes no azeite¹¹⁴.

Os compostos fenólicos presentes no azeite podem atingir os 196-500 mg/kg¹¹³, onde leves variações destes valores se traduzem em alterações na qualidade do produto. Os fenóis deste óleo podem-se dividir em três categorias: fenóis simples, secoiridoides e lignanos. Estes grupos fenólicos incluem compostos como o tirosol, hidroxitirosol¹¹¹ (Figura 2.20) que são fenóis simples que proveem da hidrólise de secoiridoides como o oleuropeino, após o azeite ser guardado durante muito tempo¹¹⁵, o que os torna muito propícios a serem detetados durante análises químicas de fragmentos arqueológicos.

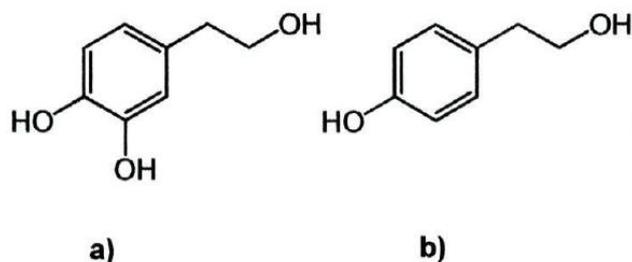


Figura 2.20 – Estrutura química de álcoois fenólicos presentes no azeite: a) Hidroxitirosol; b) Tirosol¹¹¹.

O esqualeno é um triterpeno e um dos maiores intermediários na síntese de colesterol. O que o torna um ótimo traçador molecular destes produtos é o fato de estar presente no azeite numa percentagem muito mais elevada que em outros produtos alimentares, ou óleos (cerca de 0,7% enquanto que noutros será cerca de 0,002-0,03%)^{113,114}.

- **Perfumes:** Tendo sido primeiramente produzido e referenciado pelo povo egípcio, o perfume apresentava-se como um produto de elevada importância, desempenhando papéis ativos na vida de populações ancestrais¹¹⁶. Utilizados em festas, cerimónias e ritos religiosos, funerais e até na medicina ou em jogos de sedução carnal, eram obtidos pela extração da fragrância de certos materiais crus (plantas, resinas, especiarias, etc.) usando óleos vegetais (sésamo, óleo de oliveira (azeite), raiz-forte e amêndoa) como principais excipientes¹¹⁷.

É graças a descobertas arqueológicas que o nosso conhecimento sobre os perfumes existentes durante os tempos passados estão a ser correntemente revividos. Sendo reconhecido como um material social caro, este era apenas obtido pelos mais ricos que os usavam orgulhosamente não apenas nas ocasiões mais importantes, mas sim durante o dia-a-dia¹¹⁶. É devido ao facto de serem muitos os perfumes utilizados na antiguidade, e de nem todos terem as suas “receitas” esclarecidas perante os olhos de historiadores, que a análise química destas matrizes pode por vezes ser tão complicada. No entanto, graças a Dioscórides e ao seu manuscrito “*De Materia Medica*” (entre outros) onde relatou a mais completa lista de produção de perfumes da antiguidade durante o primeiro século depois de Cristo¹¹⁶, é, nos dias que correm possível a

reconstrução orgânica das suas matrizes, o que possibilita a associação entre os compostos orgânicos detetados em fragmentos cerâmicos e os perfumes que lá eram armazenados originalmente.

Para as suas produções, apesar da utilização de elementos básicos da natureza, eram necessárias muitas horas de tentativas de combinações de fragâncias até se obter o odor pretendido. Após a extração de óleos vegetais (raiz-forte, amêndoa, sésamo, ou azeite de oliveira) eram adicionados outros componentes que de acordo com as suas características, se pretendia que favorecessem a qualidade do produto (tabela 2.3) ¹¹⁶.

Tabela 2.3 – Materiais usados no fabrico de perfumes na antiguidade.

Materiais	Origem botânica	Função
Óleos vegetais	Azeite - <i>Olea europaea</i> Óleo de sésamo - <i>Sesamum indicum</i> Óleo de acácia-branca - <i>moringa oleifera</i> Óleo de amêndoa - <i>Prunus amygdalus</i>	Excipiente
Plantas aromáticas	Jasmim - <i>Jasminum gradiflorum</i> Rosa - <i>Rosa centifolia</i> Narciso - <i>Narcissus poeticus</i> Lírios - <i>Lilium candidum</i>	Fragrância
Resinas	Mirra – <i>Cammiphora myrrha</i> Bálsamo – <i>Cammiphora opobalsamum</i> Ládano – <i>Cistus ladaniferus</i> Gálbano – <i>Ferula galbaniflua</i>	Fragrância e Fixador
Especiarias	Canela – <i>Cinnamomum verum</i> Cardamomo – <i>Elettaria cardamomum</i> Açafrão – <i>Crocus sativus</i>	Fragrância
Vinho	<i>Vitis vinifera</i>	Fragrância
Mel	<i>Apis melífera</i> (por exemplo)	Preservante

No âmbito de análises químicas efetuadas a artefactos cerâmicos arqueológicos, e tendo em conta o tipo de materiais utilizados para a produção dos produtos aromáticos – perfumes, torna-se imediata a busca por marcadores de substâncias naturais vegetais.

Os aminoácidos são mais uma vez, um tipo de compostos orgânicos que ao serem provenientes da degradação de proteínas, estarão presentes nas matrizes cerâmicas que terão sido utilizadas para o armazenamento de perfumes. Em todas as receitas descritas por *Dioscórides* havia referência à utilização de compostos resinosos como fixadores da preparação para se evitar a rápida volatilização do preparado^{115,116}. Justifica-se assim a presença de α/β -pineno, α -copaeno, xileno, etc., todos eles compostos terpênicos presentes em resinas naturais. Os restantes “ingredientes” (flores, especiarias e óleos) provém essencialmente hidratos de carbono terpênicos - Cineole, Mirceno, linalool, limoneno, entre outros, todos eles comuns em substâncias vegetais naturais¹¹⁷. Característicos apenas de óleos excipientes, existem também ácidos gordos como o palmítico (C₁₆), esteárico (C₁₈), oleico (C_{18:1}), linoleico (C_{18:2}) e compostos lipídicos esteróis como o esqualeno, glicerol e β -sitoesterol^{116,117,118}. Da libertação destes óleos e terpenos, podem muitas vezes ser “arrastados” os ácidos pimárico e abiético sendo que deste último, um diterpeno, pode surgir o ácido dehidroabiético, um marcador de queima de biomassa vegetal muito relevante na constituição de madeiras (coníferas de pinheiro), de onde era retirada grande parte das resinas¹¹⁷.

2.6 – Técnicas para a análise de ADN antigo

Uma análise exaustiva de materiais arqueológicos necessita obrigatoriamente da contribuição de especialistas de áreas científicas complementares. Neste sentido, a biologia, a par de outras ciências, pode também dar o seu contributo fundamental para esta problemática. Nos materiais cerâmicos estudados, a par dos resíduos químicos frequentemente encontrados e identificados por técnicas cromatográficas, é possível também a deteção de fragmentos de cadeia reduzida de moléculas de ADN características do conteúdo original dos vasos. Uma correta abordagem da genética molecular, recorrendo a um conjunto de técnicas de **extração, purificação, amplificação e sequenciação** de ADN, a par da utilização de técnicas bioinformáticas para a análise dos resultados obtidos, poderão permitir a reconstituição dos fragmentos de moléculas de ADN degradado de forma a identificar a cadeia original.

- **Técnicas de extração ADN:** A extração e a purificação de ADN é o primeiro passo em qualquer trabalho que envolva a análise de ADN antigo¹¹⁹ (e contemporâneo). Este processo é fulcral, uma vez que se espera que qualquer molécula de ADN remanescente nas amostras em causa, para além de se apresentarem presentes em quantidades diminutas, apresentar-se-ão também em condições de conservação muito debilitadas e portanto, de forma extremamente degradadas degradado (produto das condições a que se poderão expor e da idade avançada). Relembrar que ADN, é uma molécula orgânica onde está inserida toda a informação genética dos seres vivos, sendo portanto, uma molécula portadora da habilidade única de ser específica para todos os organismos existente e conhecidos. Apesar da existência de diferentes técnicas de extração de ADN, utilizando metodologias distintas, é comum a realização de etapas onde ocorre uma especial atenção para a eliminação do material não passível de ser analisado, de forma a permitir a obtenção do ácido nucleico (ADN) diagnóstico. Assim, deve descartar-se todo o material genético que não for de interesse (proteínas, ARN), cuja presença poderia inclusive invalidar as análises futuras^{120,121}.

Comummente, a extração de ADN antigo é conseguida quer através da aplicação de protocolos artesanais^{119,120}, quer da utilização de kits de extração. Uma extração artesanal é um método que utiliza reagentes que podem ser facilmente adquiridos e/ou preparados num laboratório de biologia molecular, como EDTA, SDS, DTT, proteínase k, etanol, fenol/clorofórmio, cloreto de sódio, entre outros, que permitem a preparação do tampão de extração e purificação do ADN das proteínas e do ARN. Assim é possível a separação dos ácidos nucleicos das restantes moléculas que os podem degradar^{119, 120, 121}.

Um outro método baseia-se na utilização de kits comerciais disponíveis para extração e purificação de ADN, sendo obrigatório utilizar kits comerciais cujo sucesso para aquele tipo de amostras já tenha sido previamente demonstrado¹²².

Por parte do analista, a escolha do kit a utilizar é um passo crucial, sendo necessário atender-se a alguns pontos, nomeadamente:

- i) A tipologia da amostra, dado que uma amostra que contenha ADN antigo e fragmentado deve ser tratada de uma forma diferente de uma amostra de ADN moderno, retirada diretamente de um tecido biológico, ou mesmo de uma amostra de sangue coletado de um paciente vivo onde os ácidos nucleicos não estarão tão degradados;
- ii) A intenção de uso, uma vez que a qualidade e pureza de ADN obtido pelo kit em questão deve ser compatível com a sua aplicação futura (amplificação, sequenciação ou outras);
- iii) A quantidade de amostra, que costuma ser bastante reduzida em trabalhos com ADN antigo (em alguns casos é menor que 2ng/ μ l).

Todos os kits comerciais apresentam critérios básicos de aplicação, adequados a um desempenho eficiente, sendo cruciais tanto a remoção de contaminantes através de etapas de lise celular como a precipitação de ácidos nucleicos. A utilização de SDS ou outros detergentes permite a eliminação de lípidos da parede celular e de restos celulares. Por outro lado, a centrifugação, a lise proteica (muitas vezes recorrendo a proteínase K) e a remoção de ARN (através da utilização de RNases, enzimas que degradam o ácido desoxirribonucleico) são fases comuns a todos os kits e outros métodos de extração, tal como a precipitação e eluição do ADN propriamente dito^{122,123}.

Com já foi mencionado, cada kit apresenta as suas características próprias, devendo escolher-se um adequado à recuperação de ADN fragmentado e degradado^{119, 124}.

- **Nanodrop:** É um espectrofotómetro de medição de ácidos nucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (RNA) e proteínas, que permite a determinação da concentração e pureza do ADN presente, sendo por isso muito utilizado em biologia molecular. Estas análises espectrofotométricas baseiam-se no facto dos ácidos nucleicos absorverem radiação ultravioleta¹²⁵, gera um sinal elétrico diferente quando a radiação atinge o fotodetector depois de passar pelos vestígios de ADN, sendo a sua concentração de ADN (e dos restantes contaminantes) determinada com base na lei de Lambert-Beer¹²⁶. Assim, a absorvância obtida a um comprimento de onda de 260 nm corresponde à concentração de ácido nucleico na amostra. Adicionalmente, a determinação da pureza do extrato de ADN é verificada relacionando as absorvâncias obtidas entre os 260 e os 280 nm (para verificar o rácio entre ADN e RNA) e entre 260 e 230 nm (para verificar o rácio entre ADN e proteínas). Assim, os valores de absorvância (260/280 nm e 260/230 nm), mais à frente, designado por $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ localizados entre 1,8 e 2 indicam que o ADN existente é puro¹²⁶.

A particularidade desta técnica é poder ser usada diretamente em extratos de ADN sem qualquer amplificação prévia, necessitando mesmo assim de um volume de alíquota diminuto (entre 1 a 2µL de solução)^{127,128}.

- **Câmara de Fluxo Laminar:** A manipulação de ADN antigo exige um tratamento especial no sentido de evitar possíveis contaminações com ADN recente. Idealmente este trabalho deveria ser elaborado num laboratório isolado de qualquer tipo de organismos¹²⁹, sendo no entanto essa uma realidade indisponível para muitos centros de investigação. A utilização de câmaras de fluxo laminar, um equipamento profissional compacto, desenvolvido para recriar um ambiente limpo em pequenas áreas de trabalho, independentemente das condições do meio ambiente que o rodeia são a alternativa disponível. O ar filtrado existente no seu interior é constantemente injetado na área de trabalho numa só direção (de cima para baixo) garantindo um ambiente renovado e limpo. Dever-se-á limpar com álcool etílico todas as superfícies prévia e posteriormente a qualquer utilização, seguindo-se a utilização de solução de ARNses e a passagem de luz ultravioleta¹¹⁹.

- **PCR:** Polymerase Chain Reaction, é um método de amplificação de ADN a partir de extratos do mesmo. Este consiste em utilizar os mecanismos de replicação *in vitro*, tendo este, sido simplificado ao máximo para se obter o maior sucesso possível. Depois de extraído o ADN, adiciona-se-lhe uma solução tamponada com alguns elementos como o tampão (buffer), magnésio, dNTP's (bases azotadas ligadas a três fosfatos), *primers* (segmentos de ácidos nucleicos, necessários para dar início ao processo de replicação (cópia) de novas moléculas de ADN) e uma enzima de polimerização de ADN. A mistura ao ser colocada no termociclador (aparelho que permite a realização do PCR) passa por ciclos pré-programados com temperaturas e tempos previamente otimizados para cada reação. Fundamentalmente, cada passo apresenta um tempo e temperatura específicos, sendo necessário desnaturar o ADN (partir as pontes de hidrogénio), emparelhar cada metade de filamento de ADN com o *primer* utilizado (especifico) e sintetizar dois novos fragmentos de ADN iguais ao original pela ação da enzima. De seguida repete-se o ciclo, originando cada molécula de ADN novas moléculas. Este processo pode repetir-se até cerca de 40 vezes, dando-se uma replicação exponencial do material genético¹³⁰.

- **Eletroforese:** É uma técnica usualmente empregue em produtos de amplificação por PCR, onde por aplicação de uma diferença de potencial, fragmentos de ADN são devidamente separados numa plataforma em gel. As moléculas são separadas de acordo com a massa que apresentam, migrando mais rapidamente as de menor massa¹³¹. Apesar de poderem ser usados para separar proteínas e ARN, neste trabalho utilizou-se esta técnica para a migração de fragmentos de ADN.

O princípio desta técnica baseia-se no facto da molécula de ADN possuir carga negativa a valores de pH neutro e alcalino. Esta, quando sujeita a um campo elétrico migra em direção ao polo positivo (ânodo)¹³¹. Todavia, existem alguns fatores a ter em conta, como a possível utilização géis com diferentes características, onde a migração do ADN é gradualmente parada de acordo com a sua massa. Assim, enquanto um gel de agarose é usado para a separação de fragmentos de ADN maiores, o gel de poliacrilamida é utilizado para os mais pequenos¹³². Apesar de se tornar mais apelativo para este trabalho o uso de poliacrilamida, visto esperar-se a existência de ADN muito

fragmentado, este não é muito usado devido à sua elevada toxicidade e ao facto de não ser limitante a diferença obtida com a sua utilização, uma vez que o aumento da concentração de agarose no gel aumenta a eficácia da separação de moléculas pequenas. Paralelamente, um fragmento de ADN pode ser recuperado e purificado a partir de um gel de agarose^{131,132}. Para a visualização de um gel é necessária a utilização de um transiluminador de luz ultravioleta e se um corante que o permita. Apesar do brometo de etídio ser um excelente corante, as suas propriedades mutagénicas quase erradicaram a sua utilização, sendo por isso atualmente usados outros corantes igualmente eficazes, como o greensafe¹³³.

- **Sequenciação:** A sequenciação é um método bioquímico utilizado para determinar a ordem das bases azotadas numa molécula de ADN, e assim confirmar qual a espécie a que pertence. Trata-se da leitura do código genético, existindo para isso vários métodos que têm vindo a ser melhorados:

i) **Método de Maxam-Gilbert:** atualmente é o método menos utilizado. Este corta o ADN em pontos específicos através da marcação radioativa do alvo e de um processo de degradação química, produzindo fragmentos de diversos tamanhos que são separados em gel, permitindo determinar pelo seu tamanho o nucleótido que se encontra em cada posição da sequência a analisar ¹³⁴.

ii) **Método de Sanger-Coulson:** é um método enzimático que recorre a uma reação simples de polimerização. Assim, quando a extremidade 3' do ADN se encontra livre, e há conhecimento da extremidade 5', desenha-se um *primer* específico complementar da cadeia a sequenciar, que naturalmente irá, por hibridização fornecer a respetiva extremidade 3' livre até atingir o terminador. Uma vez que os nucleótidos utilizados são marcados por fluorescência, a sensibilidade de deteção dos produtos de reação é muito maior. Por eletroforese em gel de poliacrilamida, é possível a separação das diferentes cadeias simples de ADN (que diferem devido a um nucleótido). Os equipamentos destinados à deteção de fluorescência são capazes de distinguir os 4 marcadores existentes o que permite a sequenciação do ADN alvo¹³⁵.

iii) **Sequenciação de próxima geração (NGS):** A plataforma de sequenciação de próxima geração é uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional. Esta técnica é revolucionária pois consegue promover a sequenciação de ADN em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de produtos de PCR numa única corrida. Entre duas plataformas desta categoria, há duas que possuem ampla utilização em todo o Mundo: a plataforma 454 FLX da *Roche* e a Solexa da *Illumina*¹³⁶. Estas novas técnicas possuem como características comuns a capacidade de gerar mais informação que o sequenciador do tipo *Sanger* com uma grande economia de tempo e custo¹³⁶. Essa maior eficiência, provém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciação o que permite que milhares de leituras possam ser executadas de uma só vez¹³⁶. O procedimento geral de sequenciação utilizado nestes métodos consiste na síntese de ADN usando uma enzima polimerase e marcação de nucleótidos com diferentes fluoróforos. Após a clonagem *in vitro*^{136,137} a superfície de clonagem é dividida em 8 linhas que podem ser utilizadas para a sequenciação de 8 bibliotecas. Cada linha apresenta a extremidade 3' livre, sendo que à 5' liga-se um primer, dando-se a hibridização. Após o processo de PCR em fase sólida se repetir por 35 vezes ou mais, acaba por se formar um *cluster* de sequenciação. Com estes *clusters*, o sinal fluorescente gerado tem uma intensidade suficiente para garantir a sua deteção. Após uma fase de lavagem de remoção dos reagentes em excesso, dá-se a leitura pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo do processo^{137,138}.

Capítulo 3

Procedimento Experimental

3.1 – Instrumentação e reagentes: laboratórios de química analítica e de genética molecular

No desenvolvimento deste trabalho foram seguidas diferentes metodologias conforme o trabalho decorria em laboratórios de química analítica ou de genética molecular. Assim, para melhor discriminar os procedimentos adotados indicam-se para cada caso os equipamentos, reagentes e materiais utilizados.

3.1.1 – Laboratório de química analítica

Solventes e reagentes

Usaram-se solventes e reagentes de qualidade para HPLC sem qualquer tipo de purificação adicional. Utilizou-se diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), piridina e BSTFA-TMCS (99:1) adquiridos respetivamente às firmas *Fischer Chemical*, *Prolab* e *Sigma-Aldrich*. Foram também usados compostos padrão adquiridos à *Merck*, *VWR* e *Sigma-Aldrich*.

Instrumentação

As pesagens foram efetuadas numa balança analítica *AND GR-200*. A extração das amostras foi efetuada com mantas de aquecimento *Nahita Model 655*, tendo a concentração dos extratos orgânico sido efetuada sob pressão reduzida num evaporador da marca *Buchi Rotovapor R-200*. Na derivatização das amostras utilizou-se uma seringa de 100 µL de capacidade, da marca *Hamilton CO.. Reno NEVADA*, tendo-se usado uma seringa da mesma marca, de 1 µL, para efetuar as injeções manuais no cromatógrafo gasoso. Antes da injeção homogeneizaram-se os extratos orgânicos com um vortex da marca *Heidolph*.

Os espectros de FTIR foram adquiridos num espectrómetro Bomem MB104 à temperatura ambiente recorrendo a cápsulas de KBr, com uma máxima resolução de 4 cm⁻¹, numa gama de comprimentos de onda de 4000 a 500 cm⁻¹ e uma acumulação de 32 varrimentos. As análises de XRD foram executadas num difractómetro *Philips X'Pert Pro X-ray*, usando como condições de trabalho uma radiação CuKα; 40 kV, 50 mA; Vg =

1º de 2θ por minuto. O GC-MS utilizado neste trabalho é da marca *Varian 4000 Performance*, equipado com uma coluna capilar DB-5ms de 30 metros de comprimento e 0,25 µm de largura, operando em full scan entre os 50 e os 800 m/z e usando a injeção em modo splitless. O analisador de massa é do tipo armadilha de iões, com ionização por impacto eletrónico, tendo-se usado hélio como fase móvel.

3.1.2 – Laboratório de genética molecular

Solventes e reagentes

Os kits de extração de ADN de tecidos biológicos modernos e de ADN antigo foram adquiridos respetivamente às empresas *Omega Bio-Tek* (E.Z.N.A Molusco kit) e *Roche* (High Pure PCR Product Purification kit). Os *primers* específicos foram obtidos da *Stab Vida* enquanto os corantes de ácidos nucleicos (*greensafe*), as bases azotadas (DNTP's), o tampão de ativação (*loading*), o marcador molecular (*ladder*) e a agarose foram fornecidos pela empresa *NZYTECH*.

Instrumentação

As pesagens foram efetuadas numa balança analítica *AND GR-200* tendo-se usado na manipulação dos extratos pipetas *Pipetman Gilson Neo* (de capacidades entre 0,1 a 2,0 µL, de 2,0 a 20 µL, de 20 a 200 µL, de 200 a 1000 µL e de 1000 a 5000 µL). Utilizou-se um termociclador T100 da *Bio-Rad*, uma placa de eletroforese Mini-sub também da *Bio-Rad* e um transiluminador UV da VWR. A sequenciação foi efetuada num sequenciador *454 FLX Roche* pela empresa BioCant, uma entidade externa ligada ao Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

3.2 – Procedimentos experimentais: laboratório de química analítica

3.2.1 – Preparação dos materiais

A realização de um trabalho experimental criterioso requer que os materiais utilizados estejam meticulosamente limpos e descontaminados. Assim, tendo em consideração o facto de se estudarem compostos orgânicos em quantidades vestigiais, é imperioso o uso de luvas novas no manuseamento de cada artefacto, aconselhando-se a limpeza frequente das bancadas com etanol a 99%. Numa fase inicial todo o material de vidro deverá ser lavado com água da torneira e sabão, sendo posteriormente imerso durante 12h numa solução cromossulfúrica, lavado com água ultrapura e acetona e seco numa estufa a 60 °C.

Estando limpos os materiais de trabalho pode proceder-se à amostragem (Figura 3.1a), efetuando-se a raspagem de pequenas quantidades de material cerâmico, preferencialmente da superfície interior dos vasos cerâmicos. Esta deve ocorrer em diferentes zonas da superfície, de forma a limitar possíveis problemas resultantes da heterogeneidade de algumas amostras. Sendo estas análises preferencialmente qualitativas (pretende-se identificar quais os compostos orgânicos presentes, e não tanto a sua quantidade) não há em caso algum um valor pré-determinado para a quantidade de amostra a raspar, podendo esta oscilar entre um décimo de grama até cerca de uma grama, dependendo da quantidade de material orgânico disponível (em alguns casos é necessário repetir-se a recolha, alterando-se a quantidade de material a recolher). A recolha é efetuada para um almofariz de ágata, onde se pulveriza a amostra para aumentar a sua área de contacto (Figura 3.1b). A amostra é então transferida para um *ependorf* e pesada, antes de seguir para extração do material orgânico.

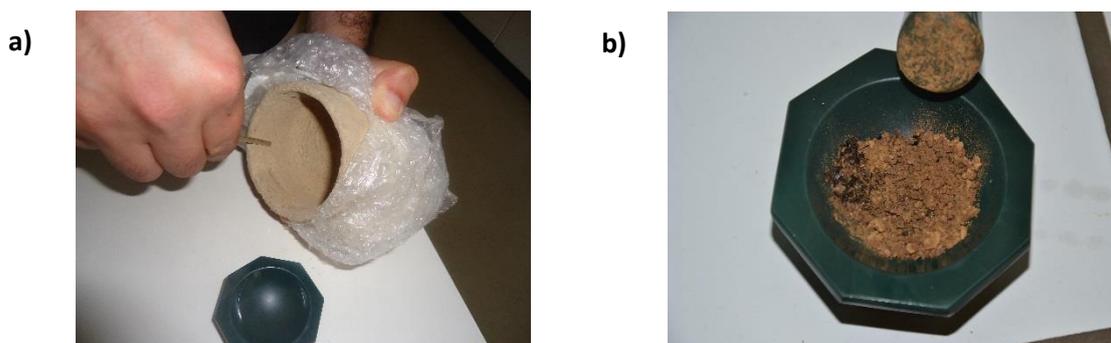


Figura 3.1 – a) Amostragem efetuada a um vaso da idade do bronze recolhido em Castelo de Vide; b) Pulverização de uma amostra raspada.

3.2.2 – Extração da amostra

Apesar de serem diversos os procedimentos analíticos disponíveis para a extração de compostos orgânicos de artefactos arqueológicos, utilizou-se neste trabalho o aparelho Soxhlet. Sendo este método de utilização mais demorada relativamente a outros métodos alternativos como a extração por ultrassons ou por micro-ondas, é todavia mais seguro por garantir não se atingirem temperaturas suficientemente elevadas que degradem os compostos orgânicos a extrair. Assim, é de notar que a temperatura máxima obtida é limitada pela temperatura de ebulição do solvente a usar. Numa fase inicial procede-se à limpeza do sistema com uma extração do cartucho (sem amostra) com DCM. Seguidamente introduz-se a amostra já pulverizada, procedendo-se durante cerca de 3 horas a uma primeira extração com DCM, extraíndo-se nesta fase os compostos menos polares. Numa fase subsequente retira-se o extrato orgânico em DCM e adiciona-se MeOH, para um novo ciclo de extrações destinado aos compostos mais polares.

3.2.3 – Concentração do extrato orgânico

Durante o processo de extração são por vezes arrastados resíduos de argila para o balão de extração (pó muito fino) que necessitam de ser removidos. Neste contexto, é recomendada a filtração do extrato orgânico com filtros de PTFE de 0,45 μm de tamanho de poro. Este procedimento é muito importante para salvaguardar de contaminações/deposições tanto o sistema de injeção como a coluna cromatográfica do cromatógrafo gasoso.

Tendo em conta que o volume de amostra é ainda muito elevado após os processos de extração e de filtração apresentando-se por isso o extrato orgânico bastante diluído, é recomendável a concentração do extrato recorrendo-se a um evaporador rotativo. Neste contexto, devem ajustar-se devidamente a pressão de vácuo e a temperatura às características do solvente a evaporar, limitando a possibilidade de perda de compostos orgânicos mais voláteis o que diminuiria a eficiência global do processo. Neste contexto procede-se à concentração das amostras até um volume de cerca de 2 mL, sendo o concentrado transferido para um vial. Os extratos de DCM são analisados antes e depois de derivatizar, enquanto os extratos de MeOH são sempre derivatizados. Para proceder-se à derivatização secam-se os vials num fluxo reduzido de gás inerte (N₂ ou Ar).

3.2.4 – Derivatização

Para que a separação dos analitos no interior da coluna cromatográfica ocorra de forma eficaz é aconselhável que ambos se encontrem na mesma gama de polaridades. Uma vez que o GC-MS utilizado estava equipado com uma coluna capilar DB-5ms constituída por uma fase estacionária apolar, os analitos de polaridade elevada têm dificuldade em ser eluídos. Nestes casos é necessário proceder-se à derivatização dos compostos adicionando-se grupos funcionais por forma a diminuir a polaridade dos compostos originais. Com a derivatização por trimetilsililação substituem-se os hidrogénios acídicos por grupos Si(CH₃)₃ (Figura 3.2). Desta forma consegue-se reduzir a polaridade dos compostos, aumentando-se a sua volatilidade e obtendo-se uma separação mais eficiente. Para promover esta reação, redissolve-se o extrato orgânico em 100 µL de piridina (solvente que serve de catalisador da reação) e adiciona-se 100 µL de agente derivatizante (BSTFA+TMCS). Posteriormente, coloca-se a mistura numa estufa a 60 °C durante 15 a 20 minutos.

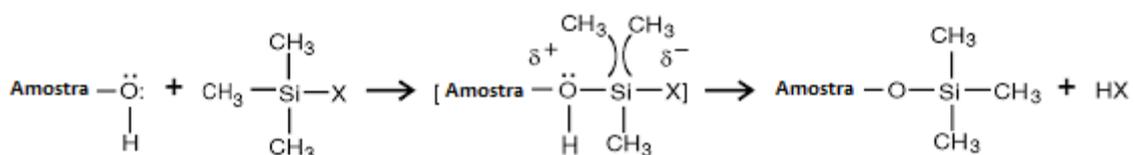


Figura 3.2 – Esquema de reação de derivatização¹³⁹.

3.2.5 – Parâmetros operacionais usados no equipamento cromatográfico

Injeta-se no equipamento cromatográfico 1 µL de amostra, encontrando-se as condições de análise descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Condições operacionais utilizadas no cromatógrafo gasoso.

Programa de temperaturas			
Temperatura / °C	°C / min	Tempo	Tempo total / min
60	0,0	1,00	1,00
80	10,0	0,00	3,00
290	7,0	12,00	45,00
Temperatura injetor	290 °C	Nota: O detetor manteve-se desligado durante os primeiros 5.50 min pela eluição neste período de subprodutos do processo de derivatização.	
Temperatura fonte iônica	290 °C		

3.2.6 – Utilização de bibliotecas de espectros de massa

Uma das grandes vantagens na utilização de espectrometria de massa é a possibilidade de comparar os padrões de fragmentação obtidos com os dados provenientes de bibliotecas comerciais de espectros de massa, como a Wiley6 e a NIST 2008, cada uma delas com cerca de duzentos mil espectros. Para além da utilização destas bibliotecas comerciais, é também possível a criação de bibliotecas domésticas concebida experimentalmente a partir da injeção de padrões analíticos.

3.2.7 – Análise de cromatogramas

Qualquer equipamento de GC-MS vem acompanhado de um software capaz de apresentar o sinal analítico num formato “amigável” e facilmente assimilável pelo utilizador. Assim, os cromatogramas representam esse sinal em função do tempo de aquisição, registando todos os picos respeitantes às substâncias detetadas. Dever-se-á estudar cada um destes picos, interpretando-se o espectro de massa respeitante no sentido de se identificarem os compostos desconhecidos e se retirarem conclusões quanto à possível origem das amostras. No nosso caso, o software em questão é o

MS_Data_Review, da Varian. A análise é facilitada pela utilização das livrarias de espectros de massa anteriormente descritas.

3.3 – Procedimentos experimentais: laboratório de genética molecular

3.3.1 – Desenho de primers

Numa primeira fase desenharam-se cinco primers (segmentos de ácidos nucleicos artificiais imprescindíveis para iniciar a polimerização de novas cadeias de ácidos nucleicos complementares) específicos para o ADN que se pretendia estudar. Como se pretendia abordar exclusivamente o estudo de preparados piscícolas (*Garum*, *Allec*, *Liquamen*, *Muria*, entre outros), o desenho dos primers pretendeu torna-los compatíveis apenas com vestígios de organismos marinhos reconhecidamente utilizados e comercializados na dieta dos romanos. Todavia, por questões económicas utilizaram-se apenas dois dos cinco primers inicialmente desenhados (designados por M₃ e M₄) (Tabela 3.1). No desenho dos primers selecionaram-se cerca de 170 sequências da biblioteca de referências (DNA barcode (5' final de mtDNA COI) que representam 24 espécies de peixe e 2 espécies de invertebrados marinhos, sendo todos eles representativos das espécies utilizadas na dieta romana na preparação de preparados de peixe. Por se esperar uma elevada diversidade genética intraespecífica usou-se um alinhamento multi-espécie para procurar regiões de ADN que mostrassem a sequência de consenso mais preservada, e por isso mais adequada para as amplificações. Todavia, verificou-se que os primers eram muito pequenos para fragmentos de mini-barcode (M₃ com 19 pb e M₄ com 66 pb (pares de bases azotadas)) o que comprometia não a “identificação” das espécies pretendidas, mas sim a sua especificidade. Por essa razão utilizou-se um novo conjunto de primers já conhecidos (Tabela 3.2), por serem específicos das espécies de peixes selecionadas, sendo também específicos de alguns gastrópodes que poderiam ter sido também empregues nestes preparados de peixe. Esta nova combinação de primers surgiu como uma alternativa aos primers desenhados inicialmente, por estes já terem sido testados com sucesso em amostras de tecido biológico moderno. Estes, diferem dos primers M₃ e M₄ por amplificarem fragmentos de

ADN maiores, o que tende a ser pouco usual quando se trata de ADN antigo, que teoricamente se espera estar bastante fragmentado^{77,78,81}.

Tabela 3.2 - Primers utilizados nos estudos de amplificação de ADN antigo.

Primers	Sequência primer 5'-3'	Tamanho de produto
M ₃ Forward M ₃ Reverse	TGCTCCTAGCCTCTTCCAGGGG CCCCCATCTGACAAGTTCC	60 pb
M ₄ Forward M ₄ Reverse	GGGGCCGGAACAGGTTG CTTTGTGGACGATCCACTCCCT	107 pb
Micoi Forward Lobo Reverse	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC TAAACYTCWGGRTGWCCRAARAAYCA	313 pb
Lobo Forward Micoi Reverse	KBTCHACAAAYCAYAARGAYATHGG GGRGGRTASACSGTTCASCCSGTSCC	319 pb
Micoi Forward Geller Reverse	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA	308 pb
Geller Forward Micoi Reverse	TITCIACIAAYCAYAARGAYATTGG GGRGGRTASACSGTTCASCCSGTSCC	317 pb

3.3.2 – Avaliação *in silico* de especificidade de primers (BLAST)

Testou-se a capacidade das sequências de mini-barcodes (primers) identificarem unicamente cada uma das 26 espécies previamente selecionadas, pela submissão das mesmas ao algoritmo GeneBank BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este compara as informações de sequências introduzidas com outras constantes em bibliotecas estabelecidas, apresentando-se na figura 3.3 para cada um dos mini-barcodes a percentagem exata e de resultado exclusivo para as espécies sob análise. Com base nestes testes preliminares *in silico* concluiu-se que todos os mini-barcode são capazes de amplificar as sequências de organismos pretendidos, apresentando no entanto alguns um comportamento mais favorável comparativamente aos restantes. Assim, como se pode verificar na figura 3.4, o primer M₃ é bastante menos específico que o primer M₄, devendo-se este facto aos diferentes tamanhos de ambos (19 pb em

contraste com 66 pb), sendo muito similares as combinações dos restantes (Lobo forward e reverse e Geller forward e reverse) com os Micoi forward e reverse.

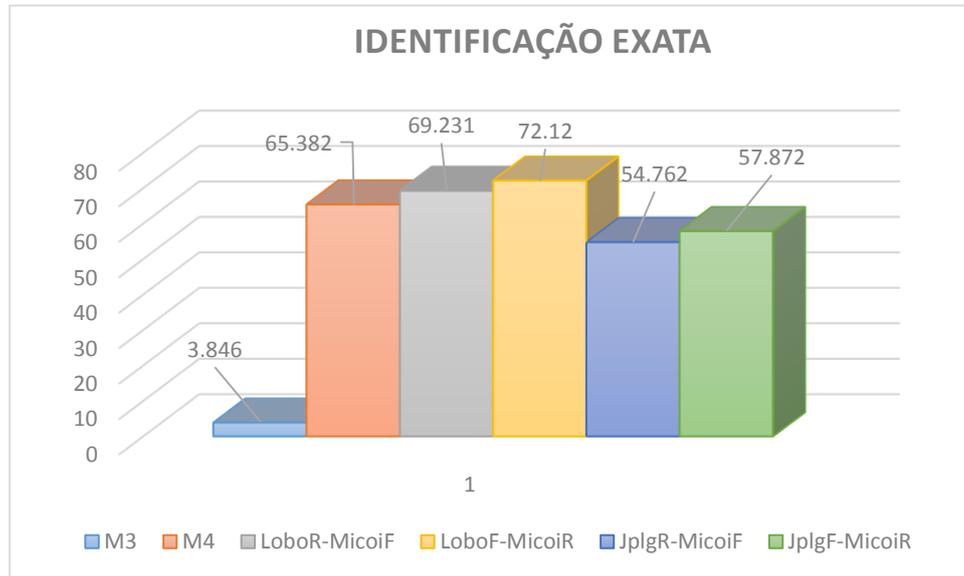


Figura 3.3 – Análise *in silico* da habilidade de identificação única das 26 espécies de organismos marinhos por parte dos mini-barcodes utilizados. As taxas de identificação específica dos primers são: M₄ – 65,4%; M₃ – 3,8%; LoboR-MicoiF – 69,23%; LoboF-MicoiR – 72,1%; GellerR-MicoiF – 54,7%; GellerF-MicoiR – 57,8%.

3.3.3 – Extração de ADN de tecidos biológicos modernos

Realizaram-se testes preliminares com amostras de peixe moderno, tendo-se seguido um protocolo para ADN “moderno” e usado o Kit de extração E.Z.N.A Moluscos da Omega Bio-Tek, segundo as instruções fornecidas pelo fabricante indicadas em anexo (Anexo 2, A-2.1).

3.3.4 – Otimização de primers

Após a verificação *in silico* da habilidade dos primers desenhados para amplificarem especificamente as espécies de organismos selecionados, efetuaram-se testes *in situ* usando ADN de tecidos biológicos modernos, ou seja, tecidos em excelentes condições de conservação. Pretendeu-se com este procedimento obter garantias do correto funcionamento do método, otimizando-se também tanto a temperatura das várias fases de PCR, como as concentrações dos “produtos de PCR” a

adicionar em cada mistura (dNTP's, H₂O, Buffer, DMSO, primer reverse e forward e enzima de polimerização) de forma a obter-se bandas perfeitas no gel de agarose. Depois de otimizado o processo, este extrato ADN foi usado como controlo positivo em todas as experiências com ADN antigo.

3.3.5 – Extração de ADN antigo

Considera-se o ADN, antigo sempre que ocorre a remanescência de ácidos nucleicos provenientes de produtos biológicos, associados (ou não) a materiais arqueológicos. Neste caso específico, trata-se da extração de ADN de material orgânico descoberto no interior de um contentor utilizado no comércio de preparados piscícolas, onde ainda é visível a presença de dentes, espinhas e vértebras de peixes. Assim, testou-se a extração de ADN usando três métodos diferentes, dois usando um kit especificamente comercializado para esse efeito, e um terceiro usando produtos químicos comumente disponíveis em qualquer laboratório de biologia molecular:

1. **High Pure PCR Product Purification Kit** – Usou-se este kit seguindo-se as instruções fornecidas pela *Roche*, apresentadas no anexo 2, A-2.2
2. **High Pure PCR Product Purification Kit – método modificado** - Neste caso, aplicou-se às amostras o método anterior, tendo-se adicionado Proteinase K antes de uma incubação mais longa que o indicado, de forma a tentar promover o processo de digestão enzimática. Adicionou-se também clorofórmio:isoamil (2:1) para precipitar os ácidos nucleicos. O método utilizado é descrito em pormenor no anexo 2, A-2.3.
3. **Metodologia de extração artesanal “Foley”⁷⁷** - O método aplicado é descrito por Foley⁷⁷ como sendo uma metodologia alternativa e de simples aplicação, adequada à extração de ADN antigo. O nome “artesanal” atribuído foi escolhido devido à grande facilidade de preparação do método, onde são utilizados materiais e reagentes de fácil acesso em qualquer laboratório de biologia molecular. O método é descrito em pormenor no anexo 2, A-2.4.

3.3.6 – Amplificação de ADN antigo por preparação de PCR's

A amplificação de ADN antigo deve decorrer seguindo-se uma série de passos de forma a prevenir contaminações, passando pela utilização de um laboratório isolado e estéril (neste caso recorreu-se à camara de fluxo laminar), pipetas esterilizadas e reagentes puros. Assim, prepararam-se misturas de produtos de PCR de 12,5 µL (metade do volume usualmente adotado neste tipo de preparações) incluíram os primers a utilizar (forward e reverse), água ultrapura, dNTP's, tampão (buffer), enzima de polimerização (Phusion High-Fidelity DNA polymerase da Thermo Scientific), DMSO e o ADN que se pretendia amplificar. Em todos os ensaios deve incluir-se um controlo negativo (um produto onde não se incluiu qualquer tipo de ADN) e um controlo positivo (um produto onde se incluiu ADN proveniente de uma amostra já previamente amplificada num teste anterior, usualmente ADN "moderno"). Após a preparação dos produtos levam-se as amostras ao termociclador para promover a amplificação por PCR (Tabela 3.3). Finalmente é corrido o gel de 1,5% de agarose numa placa de eletroforese (90 mV durante 35 minutos), utilizando-se 3,0 µL de GreenSafe (NZYTech) para colorir os ácidos nucleicos e 3,0 µL de marcador molecular (NZYTech) para a identificação do tamanho das bandas detetadas. O resultado final é visualizado e fotografado à luz ultravioleta num transiluminador UV VWR.

Tabela 3.3 – Ciclos de temperatura utilizados nas reações de amplificação de ADN antigo em função do primer utilizado.

Ciclos de PCR utilizado com primers M₃ e M₄
1- Desnaturação a 95°C (5min)
2- (30 ciclos) – Desnaturação a 95°C (30s), hibridização a 44.3°C (1min) e extensão a 72°C (30s)
3- Extensão final a 72°C (10min.)
Ciclos de PCR utilizando combinações de primers Micoi, Lobo e Geller
1- Desnaturação a 94°C (5min)
2- (6 ciclos) – Desnaturação a 94°C (30s), hibridização a 62°C (30s) e extensão a 72°C (1min)
3- (35 ciclos) – Desnaturação a 94°C (30s), hibridização a 46°C (30s) e extensão a 72°C (1min)
4- Extensão final a 72°C (10min.)

3.3.7 – Sequenciação

Na preparação dos produtos de PCR são usualmente utilizados cerca de 25 μL de mistura dos elementos necessários para a sua preparação (volume padronizado que pode variar). Contudo, apenas se usam 5 μL para correr o gel de agarose, sobrando 20 μL em cada tubo. Assim, sempre que se apresente um resultado positivo aquando da realização da eletroforese, *i.e.* bandas fortes e limpas num gel de agarose, reúnem-se as condições necessárias para enviar os produtos restantes para sequenciação. Neste caso, decidiu-se realizar este trabalho numa empresa externa, a BioCant, com sede em Cantanhede. Nesta empresa, os produtos foram corridos num sequenciador *454 FLX Roche* (tendo-se neste processo aguardado vários meses até perfazer a placa de amostras), e os resultados da sequenciação enviados para o laboratório em formato digital, para se proceder a uma análise bioinformática.

3.4 – Amostras estudadas

Neste trabalho foram estudadas uma amostra proveniente do interior de um contentor cerâmico e vários fragmentos cerâmicos de artefactos arqueológicos de diferentes proveniências (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Listagem das amostras estudadas com indicação do seu número de código, origem geográfica e massa recolhida para análise.

Origem Geográfica	Código	Massa recolhida (g)
Castelo de Vide	- Vaso 10	0,4000
	- Vaso 6	0,3503
	- Vaso 11	0,1192
La Nogueira, Tudelilla, La Rioja	- 608	0,0509
	- 707	0,1388
	- 784	0,0832
	- 71.CRP.N	0,0521
Conimbriga	- 72.B.F6	0,1071
	- 71.B43	0,1567
	- 68.R1.M	0,2142
	- Pontos – Mamoia da Eireira	0,8160
Afife	- Linhas – Mamoia da Eireira	0,5381
Lamas	- Linhas – Mamoia de Lamas	0,2021
Matosinhos	- Castro de Guifões	0,2589
Carvalheiras Braga	- 2210-91, 2000-91 e 2070-91	0,0914 a 0,3044
	- CarvSond-0200	0,5666
	- 2013-0421	0,1513
Martinhal, Algarve	- 11,9-4 e 11,9-3	0,3030 e 0,3633
Chaves	- Chaves	0,1145
Egito	- 40.01.82	0,2518
	- 40.01.83	0,2621
	- 40.01.84	0,2386
Cavaliças, Braga	- 1997-1031	0,9390
	- 1997-0451	0,1595
	- 1994-0315	0,0799
Castro de Vigo, Pontevedra	- Ovoide de Castro de Vigo	0,0815
Lugo, Espanha	- Ânfora A	0,8415
	- Ânfora B	0,1201
	- Ânfora C	0,1060
	- Lu03-NR5133	0,9676
	- LU03-VR4861	0,8609
	- LU03-VR5138	0,1045
Boca do Rio, Algarve	- 2010-2610	0,2955

Capítulo 4

Análise química de materiais arqueológicos

4.1 – Vasos megalíticos da idade do Bronze

4.1.1 – Pequena contextualização histórica

A anta de Currais do Galhordas (Figura 4.1) localizada no concelho de Castelo de Vide (lugar da Tapada do Souto, freguesia de S. João Baptista, distrito de Portalegre) foi descoberta em 1993 por membros da Secção de Arqueologia da Câmara Municipal de Castelo de Vide. Neste local foram evidenciadas importantes descobertas arqueológicas logo desde sua primeira escavação, efetuada no âmbito de um projeto de valorização turística, cultural e ambiental na área envolvente da albufeira da barragem da Póvoa e Meadas. O monumento megalítico é construído em granito, possuindo uma câmara poligonal e corredor longo ligeiramente desviado relativamente ao eixo de simetria da anta. Tendo como referência outros monumentos megalíticos do concelho de Castelo de Vide pode dizer-se que a anta dos Currais do Galhordas é extremamente pobre no que toca à pedra talhada, nomeadamente às pontas de seta e aos micrólitos geométricos. Os vasos cerâmicos, por sua vez, apareceram em número significativo e demonstram alguma variedade morfo-tipológica, possivelmente reflexo das inúmeras utilizações que a anta foi tendo ao longo dos tempos. Do vasto espólio encontrado estudaram-se três vasos cerâmicos, denominados vaso 6, vaso 10 e vaso 11 (Figura 4.2).

O vaso 6 surgiu com uma fratura que lhe suprimiu uma parte do bordo e da pança, encontrando-se intencionalmente encostado a um dos esteios da câmara funerária, possivelmente para que este impedisse a saída do seu conteúdo. O aproveitamento deste recipiente partido sugere tratar-se de uma reutilização, pelo que o material orgânico identificado no seu interior tanto poderá relacionar-se com a “última” utilização do recipiente, como com outras utilizações anteriores, eventualmente muito mais recuadas no tempo. A semelhança encontrada entre o conteúdo dos vasos 6 e 11 poderá corroborar a primeira possibilidade. Os vasos 10 e 11 surgiram em posição invertida, o que permite levantar duas hipóteses: i) os vasos foram colocados no interior da anta com o conteúdo agora identificado, tendo sido posteriormente invertidos; ii) os vasos foram depositados em posição invertida, relacionando-se os respetivos vestígios orgânicos com a sua utilização num outro contexto que não o do monumento megalítico.



Figura 4.1 – Anta do Currais do Galhordas durante a primeira escavação em setembro de 2011.

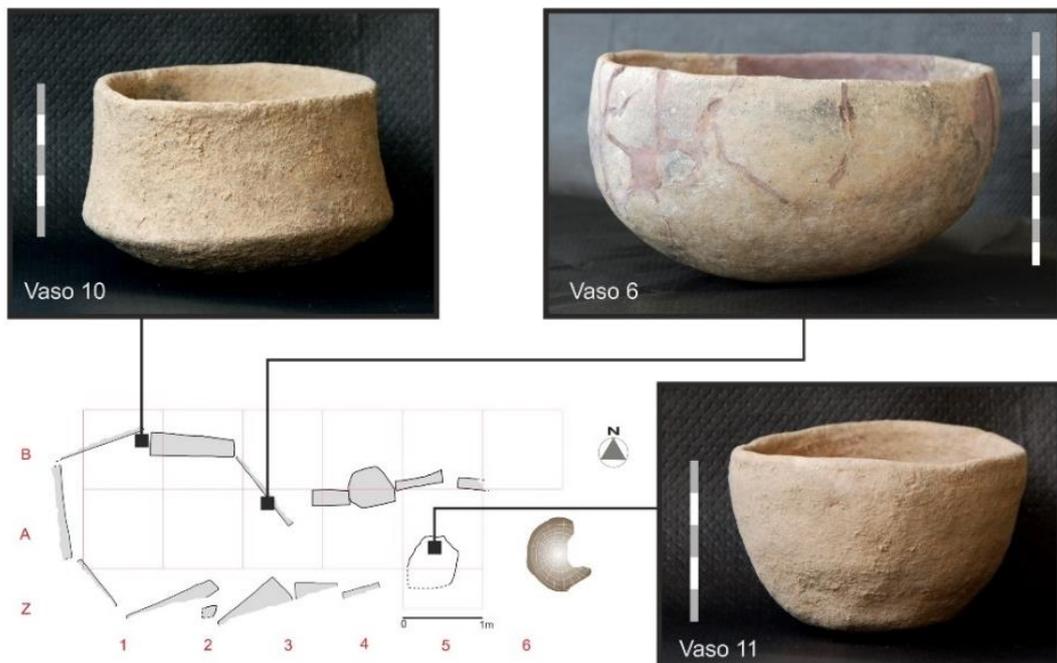


Figura 4.2 – Vasos analisados. Os vasos 6 e 10 foram recolhidos na câmara funerária e o vaso 11 no corredor.

4.1.2 – Resultados obtidos e conclusões

Na figura 4.3 apresenta-se, como exemplo, o cromatograma do extrato metanólico respeitante ao vaso 6 (optou-se por não incluir o cromatograma relativo ao vaso 11 pelo facto das conclusões obtidas serem similares), e nas figuras 4.4 e 4.5 os cromatogramas referentes ao vaso 10. Na Tabela 4.1 apresenta-se a correspondência para os compostos considerados mais relevantes.

Tabela 4.1 – Tabela de compostos característicos encontrados individualmente nos vasos 6, 10 e 11.

Nº	Compostos	Vaso 6	Vaso 10	Vaso 11
1	Lisina	✓	✓	✓
2	Ácido succínico	✓	✓	✓
3	Linalol	✓	✓	
4	Prolina		✓	✓
5	Levoglucozano		✓	✓
6	Glicerol		✓	
7	Ácido miristoleico	✓	✓	✓
8	Fucose		✓	
9	Melibiose		✓	✓
10	Dulcitol		✓	
11	Ácido palmitoleico	✓	✓	✓
12	Ácido palmítico	✓	✓	✓
13	Oleanitrilo	✓	✓	✓
14	Ácido linoleico	✓	✓	✓
15	Inositol		✓	✓
16	Hexadecenamida	✓		✓
17	Ácido oleico	✓	✓	✓
18	Ácido esteárico	✓	✓	✓
19	Ácido desidroabiético	✓	✓	
20	β-sitosterol	✓	✓	
21	Sucrose	✓	✓	✓
22	Colesterol	✓	✓	✓

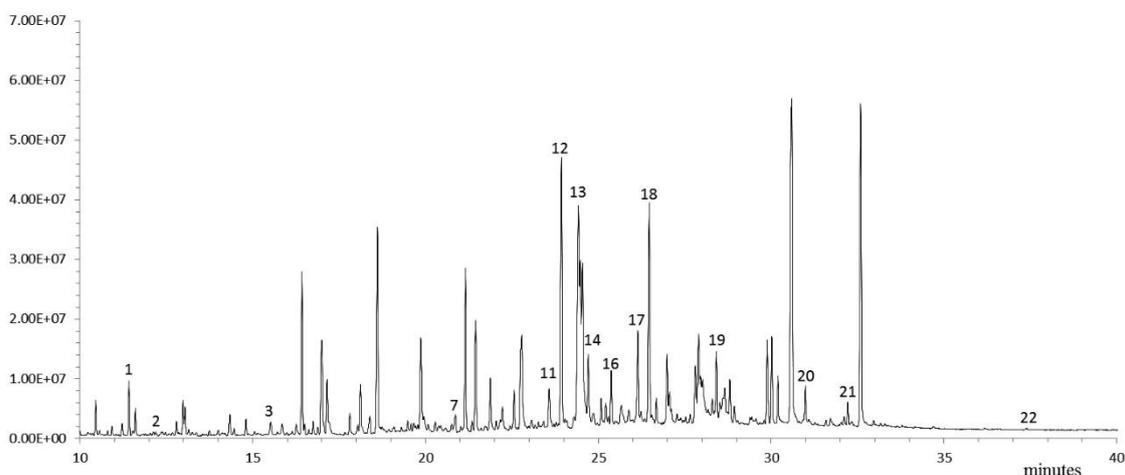


Figura 4.3 – Cromatograma em modo *Full Scan* do extrato de metanol referente ao Vaso 6.

Da análise efetuada aos três vasos podem retirar-se as seguintes conclusões:

- **Vaso 6:** Detetaram-se ácidos orgânicos característicos de sumo de uva ou de bagos de uva fermentada, como os ácidos succínico, málico, cinâmico e fumárico²⁶. A presença de colesterol, ácido fitânico e alguns ácidos ómega como os ácidos erúico ($C_{22:1,cis9,\omega9}$), miristoleico ($C_{14:1,cis9,\omega7}$) e palmitelaídico ($C_{16:1,trans9,\omega7}$) sugerem a existência de vestígios de peixe⁹³. Esta hipótese é reforçada pela presença dos aminoácidos glicina, asparagina, alanina e tirosina, que podem ter origem na hidrólise das proteínas de peixe^{140,141}. Os compostos oleanitrilo, oleamida e fitol¹⁴², assim como a hexadecanamida e octadecanamida sugerem a presença de algas ou plantas aquáticas¹⁴³, corroborando a hipótese anteriormente avançada sobre a presença de peixe. Foram identificados diversos compostos característicos de óleos de plantas, como o isoeugenol, linalol, β -sitosterol ou estigmasterol^{79,144}. A deteção de α -pineno e de ácido desidroabiético, um produto da oxidação do ácido abiético²⁶ suporta a hipótese de se tratar de vestígios de plantas resinosas como o pinheiro. A ausência de levoglucosano, um produto da degradação térmica da celulose¹⁰⁸ indica que o conteúdo do vaso não foi cozinhado.

A interpretação destes resultados sugere que o conteúdo orgânico do recipiente seria composto por bagos de uva ou frutos vermelhos e peixe não cozinhado. A este propósito é de referir a existência de um curso de água a poucas centenas de metros da anta (ribeira de Nisa) onde os peixes poderiam ter sido capturados.

- **Vaso 10:** Na figura 4.4 apresenta-se um cromatograma do extrato metanólico obtido a partir do vaso 10, encontrando-se assinalados os compostos mais relevantes. Os resíduos orgânicos mostram compostos típicos de gorduras em elevado estado de degradação. De facto, os triacilgliceróis presentes em gorduras animais e em óleos vegetais degradam-se rapidamente em ácidos gordos, exibindo glicerol e elevadas quantidades dos ácidos *n*-alcanóicos palmítico ($C_{16:0}$) e esteárico ($C_{18:0}$) e contribuições menores dos ácidos de cadeia mais curta. Nestas condições é frequente encontrar-se apenas glicerol e ácidos gordos livres, indicando a degradação total dos triacilgliceróis. A razão entre os ácidos $C_{16:0}$ e $C_{18:0}$ é por vezes usada como um indicador da origem animal ou vegetal das gorduras encontradas^{145,146,147}.

Se o ácido palmítico se apresentar mais abundante que o esteárico poderá indicar a presença de gordura vegetal¹⁴⁶ enquanto uma maior quantidade de ácido esteárico aponta para a origem animal da gordura.

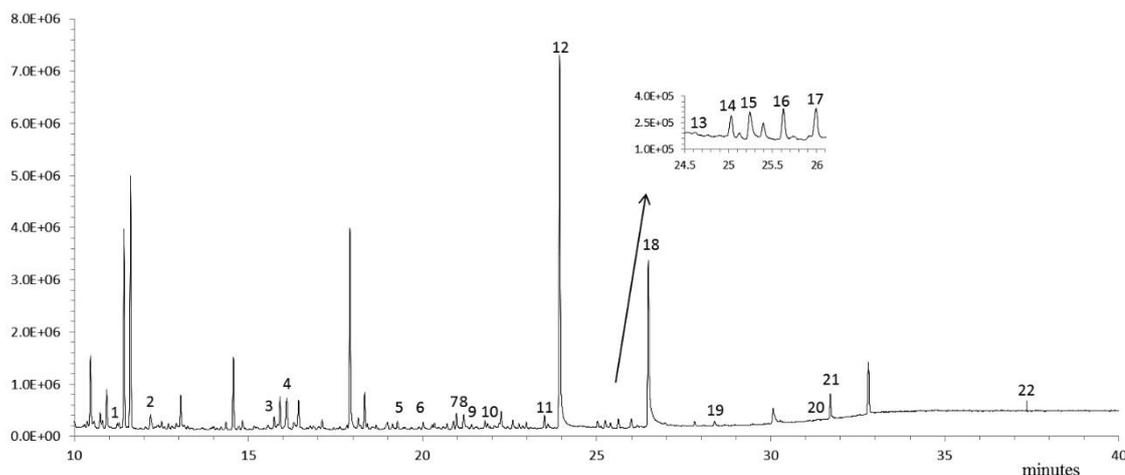


Figura 4.4 – Cromatograma em modo *Full Scan* do extrato de metanol referente ao Vaso 10.

Neste contexto vários autores associaram a ocorrência de diferentes razões $C_{16:0}/C_{18:0}$ à presença de material orgânico de origens distintas^{146,148}.

Assim:

- i) $C_{16:0}/C_{18:0} < 1.3$ - gorduras de animais ruminantes
- ii) $2.2 < C_{16:0}/C_{18:0} < 4.9$ - leite e derivados, ou gorduras de animais não ruminantes
- iii) $4.0 < C_{16:0}/C_{18:0} < 9.4$ - azeite

Na análise deste vaso detetou-se glicerol, ácidos orgânicos saturados como o sucínico e o láctico, ácidos gordos insaturados como o oleico, linoleico, palmitoleico e eláidico e elevadas concentrações dos ácidos palmítico e esteárico relativamente aos restantes ácidos, com uma razão $C_{16:0}/C_{18:0}$ entre 1,4 e 2,5. De acordo com as informações apresentadas anteriormente esta razão sugere a presença de restos de leite ou de gordura de animais não ruminantes^{146,148}. A distinção entre gorduras animais ou leite é normalmente efetuada por técnicas isotópicas¹⁴⁷ que não se encontraram disponíveis para este trabalho. Contudo, sabendo que a degradação do leite origina

quantidades mais elevadas de ácidos de menor cadeia, como os ácidos láurico ($C_{12:0}$) e mirístico ($C_{14:0}$)¹⁴⁹, pode distinguir-se entre a presença de resíduos de carne ou de leite avaliando-se os níveis destes dois ácidos.

Na figura 4.5 apresentam-se os cromatogramas relativos a estes dois compostos, obtidos por extração dos iões 257 e 285 correspondendo respetivamente aos ácidos láurico e mirístico. Da análise destes cromatogramas podem observar-se picos intensos sugerindo tratar-se de leite, de acordo com os pressupostos anteriormente mencionados. Esta conclusão é também suportada pela presença de aminoácidos provenientes da degradação de proteínas animais, pelo colesterol e pelas formas oxidadas deste composto.

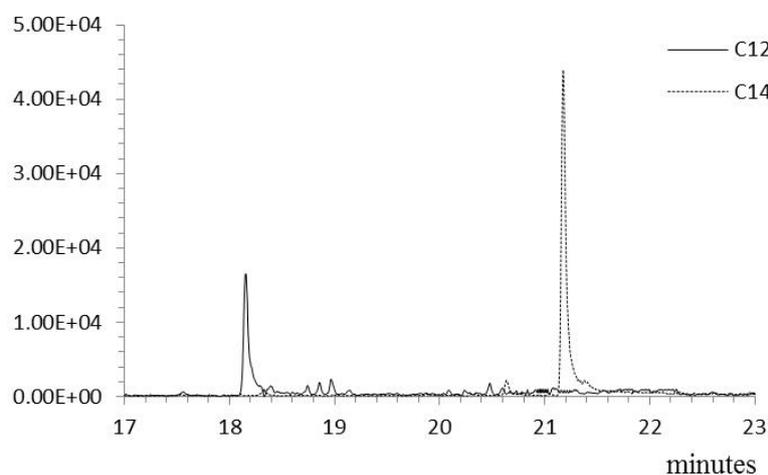


Figura 4.5 – Sobreposição de cromatogramas em modo *SIM* (*S*ingle *I*on *M*onitoring) relativos aos ácidos láurico (m/z 257) e mirístico (m/z 285).

Encontram-se ainda compostos resultantes da queima de biomassa vegetal^{26,108}, particularmente de madeiras resinosas como o pinheiro (levoglucosano, ácidos abiético, pimárico e desidroabiético), indicando a utilização destas no aquecimento/preparação dos materiais orgânicos ou eventualmente na iluminação da anta.

A presença de compostos característicos de óleos de plantas como o isoeugenol, oleanitrilo, octadecenamida, quercetina, fitol e germanicol pode indicar i) uma contaminação ou reutilização do vaso, ou ii) a utilização de plantas juntamente com o leite^{144,150,151} como ainda se faz na preparação de queijo da Serra da Estrela. Refira-se

que o leite de animais domésticos, nomeadamente de ovicaprídeos, está normalmente associados a estas primeiras sociedades agro-pastoris².

- **Vaso 11:** Os resultados da análise química ao vaso 11 encontram-se em linha com os apresentados para o vaso 6, pelo que se optou por não se apresentar os cromatogramas respetivos. Neste vaso detetou-se um grupo de ácidos orgânicos característicos da presença de sumo de uva ou de bagos de uva fermentada, como os ácidos tartárico, sucínico, málico, fumárico e treónico, entre outros²⁶. Encontraram-se também vestígios da presença de peixe documentados pelo colesterol e pelos ácidos fitânico, vacénico ($C_{18:1,\omega 7}$), palmitelaídico ($C_{16:1,trans-9,\omega 7}$) e ricinoleico ($C_{18:1,cis-9,\omega 9}$)⁹³. Os aminoácidos lisina, prolina e glicina podem igualmente provir da hidrólise das proteínas de peixe^{140,141}. A deteção de isoeugenol, linalol e licoperseno sugere a presença de óleos de plantas^{79,144}. O levoglucosano, um produto da degradação térmica da celulose, indicia que o conteúdo do vaso foi cozinhado ou que o vaso esteve nas proximidades de uma fogueira¹⁰⁸.

A interpretação destes resultados sugere que o conteúdo orgânico do recipiente cerâmico seria composto por bagos de uva e peixe. O conteúdo do vaso terá sido cozinhado ou exposto ao fumo.

4.2 – Ânforas provenientes de La Rioja, Espanha

4.2.1 – Pequena contextualização histórica

A estação arqueológica de La Nogueira situa-se na região de La Rioja, no norte de Espanha. Esta estação é escavada com o patrocínio de uma adega vinícola pertencente à Dinastia Vivanco, proprietária dos extensos terrenos que rodeiam o local. Nesta estação existe um projeto orientado no sentido de se criar e manter um museu, onde se expõe a história do local intimamente ligado à produção vínica desde há mais de dois mil anos¹⁵². Deste local foram apresentados para análise 3 fragmentos de ânfora datados da ocupação romana e medieval. Os fragmentos 608 e 784 (Figuras 4.6a e 4.6b) são provenientes de uma vila romana do século I, onde estão atualmente conservados os escombros chamuscados de uma cave vinícola subterrânea, resultante de um grande incêndio que arruinou o edifício por completo e motivou o seu abandono. O fragmento

707 (Figura 4.6c) foi recuperado de uma exploração de agrária medieval do século XV de estruturas muito modestas. Neste local, destaca-se a existência de um extenso campo de cereais.

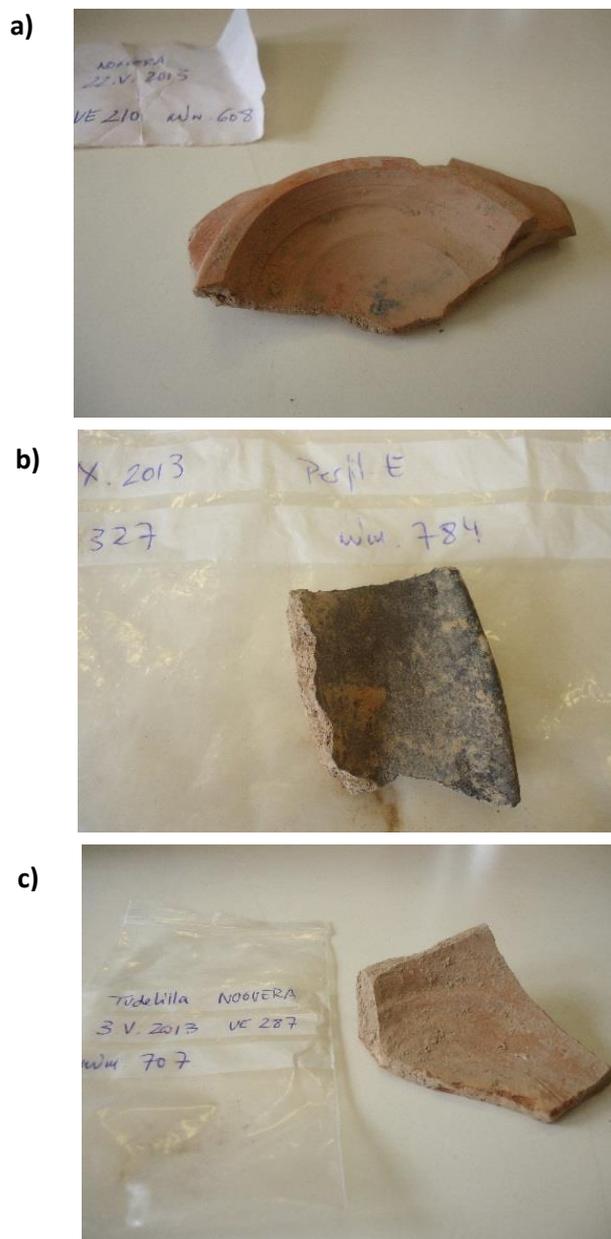


Figura 4.6 – a) Fragmento de ânfora romana 608; b) fragmento de ânfora romana 784; c) fragmento de ânfora medieval 707.

4.2.2 – Resultados obtidos e conclusões

Os resíduos orgânicos presentes nas paredes das cerâmicas foram identificados pela análise dos extratos metanólicos correspondentes (Figura 4.7), sendo os compostos mais relevantes apresentados na forma de tabela (Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4).

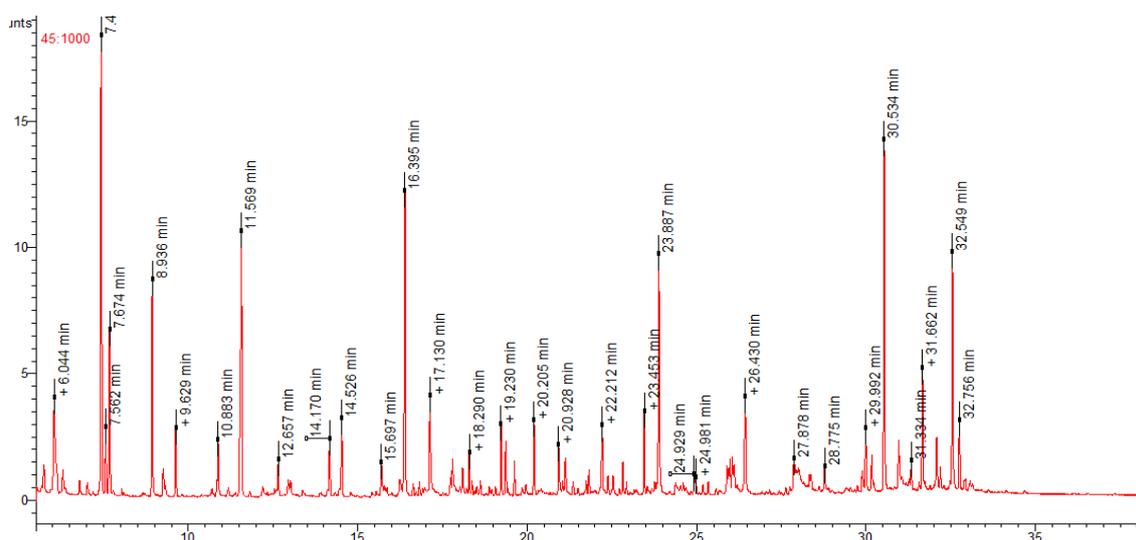


Figura 4.7 - Cromatograma em modo *Full Scan* do fragmento de ânfora 608 de La Rioja, após extração em MeOH.

Ânfora romana 608 - O primeiro grupo de compostos químicos são os ácidos orgânicos indicadores da presença de vinho. Destaca-se pela sua importância o ácido tartárico, o principal ácido do vinho, mas também os ácidos succínico, mandélico, málico, cinâmico e fumárico²⁶. O segundo grupo de compostos são indicadores da queima de biomassa vegetal como a madeira e folhagens. O levoglucosano é o principal indicador desta queima, sendo formado durante a pirólise da celulose presente em todas as madeiras ou folhagens^{108,153}. O ácido desidroabiético é um biomarcador diterpénico emitido durante a combustão de lenha de espécies resínicas como o pinheiro²⁶. A deteção destes dois compostos é compatível com a informação de que a vila romana terá sofrido um incêndio, onde terá sido queimada madeira de espécies resíneas.

Tabela 4.2 – Tabela de compostos orgânicos encontrados na análise do fragmento de ânfora romana 608.

Ácidos orgânicos indicadores da presença de vinho				
Tartárico	Sucínico	Mandélico	Cinâmico	Treónico
Fumárico	Málico	Azeláico	Valérico	Adípico
Adipínico	Levulínico	Lático	Acético	Manónico
Benzenoacético	Benzaldeído	3-Oxovalérico	Mercaptosucínico	Benzóico
Queima de biomassa vegetal				
Levoglicosano	Ácido desidroabiético			
Óleos vegetais				
Oleanitrilo	Quercetina	β -sitoesterol	Estigmasterol	β -caroteno
Ácido fitânico	Forbol	Vanilina	Ácido linoleico	9-octadecenamida
11-eicosenamida				
Hidratos de carbono				
Arabinose	Frutose	Ribose	Altrose	Manopirranose
Ribofuranose	Xilopirranose	Inositol	Glucose	Sucose
Sucose	Xililose	Alose	Talose	

O terceiro grupo é característico de compostos típicos de óleos de plantas. O oleanitrilo é um produto da reação do ácido oleico em meio básico, sendo característico da presença de óleos de plantas na amostra¹⁴². A quercetina é um pigmento de planta encontrado frequentemente em frutos, vegetais, folhas e grainhas¹⁵⁰. O β -sitoesterol e o estigmasterol são esteróis encontrados frequentemente em óleos vegetais¹⁵⁴. A detecção destes compostos sugere que a amostra cerâmica contém resíduos de plantas (terrestres e aquáticas). A presença de ácido fitânico, um traçador da presença de peixe e seus derivados¹⁵⁴, assim como nas amidas 9-octadecenamida e 11-eicosenamida encontrada em gramíneas e microalgas^{143,155,156}, sugere que os vestígios de plantas anteriormente referidos são de plantas aquáticas, pelo que i) a zona estará na proximidade de um curso de água, que numa fase terá submergido as amostras cerâmicas, e/ou ii) terá sido usada água do curso de água para apagar o incendio descrito, tendo por isso “contaminado” as cerâmicas com algas e plantas aquáticas. O quarto grupo de compostos parece não ser relevantes para o estudo, dado que muitos autores consideram a sua origem, dever-se à degradação de material celuloso (madeiras e plantas) por atividade microbiológica^{26,108,153}.

Tabela 4.3 - Tabela de compostos orgânicos encontrados na análise do fragmento de ânfora romana 784.

Ácidos orgânicos indicadores da presença de vinho				
Tartárico	Sucínico	Mandélico	Citramálico	Treónico
Fumárico	Málico	Azeláico	Oxálico	Sórbico
Mercaptosucínico	Benzóico	3-oxovalérico	Acético	Lático
Queima de biomassa vegetal				
Levoglucosano	Ácido desidroabiético			
Óleos vegetais				
Oleanitrilo	Quercetina	β -sitosterol	Estigmasterol	β -caroteno
Licoperseno	Forbol	Olivetol	Timol	Ácido oleanólico
Quinolina	Vanilina			
Degradação de gordura de peixe				
Ácido fitânico	Colesterol	Monopalmitina	Dipalmitina	Ésteres de glicerol
Ácido erúcico	9-octadecenamida			
Aminoácidos				
Glicina	Prolina	Alanina	Leucina	
Hidratos de carbono				
Manose	Lactose	Ribose	Altrose	Manopirranose
Ribofuranose	Sucrose	Inositol	Glucose	Xilopirranose
Sucrose	Xililose	Alose	Talose	Arabinose
Adonitol	Frutose	Gulose	Maltose	

Ânfora romana 784 - A interpretação dos resultados obtidos na análise do fragmento 784 (Tabela 4.4) apresenta similaridades com a análise efetuada para a amostra 608, com uma disposição semelhante dos grupos indicadores da presença de vinho e de queima de biomassa vegetal. Todavia, verifica-se um acréscimo de compostos marcadores da presença de óleos de plantas, como o olivetol, timol, quinolina e ácido oleanólico¹⁵¹. Detetaram-se também compostos como ácidos fitânico e erúcico, a monopalmitina e a dipalmitina, considerados como indicadores para a presença de restos de peixe^{93,157}. Os aminoácidos detetados são compatíveis com a degradação das proteínas de peixe^{140,141}. Assim conclui-se ambas as ânforas estiveram em contacto com vinho e/ou peixe/plantas aquáticas, e que em alguma altura terão estado expostas a algum tipo de queima de biomassa vegetal (altas temperaturas e consequentemente, fumos).

Tabela 4.4 - Tabela de compostos orgânicos encontrados na análise do fragmento de ânfora medieval 707.

Ácidos orgânicos indicadores da presença de vinho				
Tartárico	Sucínico	Málico	Citramálico	Azeláico
Fumárico	Cítrico	Isocítrico	3-Oxovalérico	Treónico
Acético	Benzóico	Lático	2-Cetoglutárico	
Levoglucosano	Ácido desidroabiético	Ácido 7-oxodesidroabiético	Ácido pimárico	
Ácido abiético	Ácido isopimárico	Ácido 7-oxo-15-desidroxi-desidroabiético		
Aminoácidos				
Glicina	Prolina	Alanina	Aspargina	Lisina
Cisteína	Valina	Serina	Tirosina	Metionina
Ácido aspártico				
Degradação da gordura de peixe				
Ácido fitânico	Colesterol	Monopalmitina	Ácido linoleico	Ácido linolénico
Ácido lignocérico	9-octadecenamida	Ácido ricinoleico	Ácido palmitelaídico	Ácido cis-10-heptadecenóico
Hidratos de carbono				
Manose	Lactose	Ribose	Altrose	Manopirranose
Ribofuranose	Sucose	Inositol	Glucose	Xilopirranose
Sucose	Xililose	Alose	Talose	Arabinose
Adonitol	Frutose	Gulose	Maltose	

Ânfora medieval 707 - A análise a este fragmentado indicou a presença de vários tipos de compostos orgânicos similares aos encontrados nos fragmentos romanos. Foram detetados compostos característicos do vinho e queima de biomassa vegetal, tal como nos anteriores. Todavia, a elevada quantidade de compostos como os ácidos abiético, pimárico, isopimárico (tal como já se tinha verificado na amostra 784) é característica da presença de resinas, sugerindo tratar-se de um recipiente cerâmico cujo interior terá sido impermeabilizado²⁶. Detetaram-se indicadores da possível presença de peixe, contudo não há evidências da presença de óleos de plantas.

4.3 – Ânforas provenientes de escavações de Conimbriga

4.3.1 – Pequena contextualização histórica

No conjunto de ânforas da cidade romana de Conimbriga identificou-se uma produção regional de uma classe não descritas na bibliografia. Após a caracterização desta classe quanto à sua morfologia e fabrico, foi sugerida a localização genérica de mais de um centro de abastecimento de matérias-primas argilosas para a produção de materiais cerâmicos industriais em Conímbriga, sendo o seu espectro cronológico centralizado nos finais dos séc. I e séc. II d.C., precisamente a cronologia abrangida pelos vários contextos estratigráficos conimbrigenses onde ânforas desta classe foram identificadas¹⁵⁸. A identificação destas ânforas data da década de 70 do século passado, mas a exiguidade dos fragmentos não permitiu uma clara definição dos tipos¹⁵⁹. Alguns projetos atualmente em curso permitiram a identificação de fragmentos, conseguindo-se a reconstituição completa da forma (Figura 4.8).

Neste contexto receberam-se do Museu Monográfico de Conimbriga dois fragmentos pertencentes a esta nova classe de ânforas (Figuras 4.9a e 4.9b) com o objetivo de se proceder à análise química das pastas cerâmicas e dos compostos orgânicos associados às mesmas.

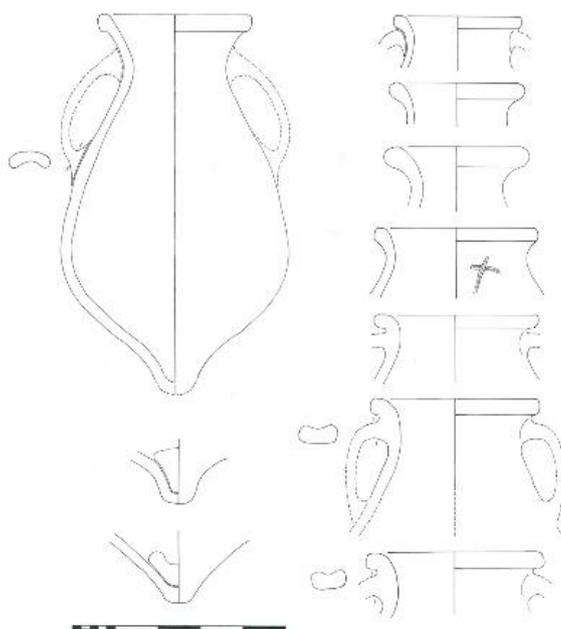


Figura 4.8 – Desenho da reconstituição da forma desta nova classe de ânforas.

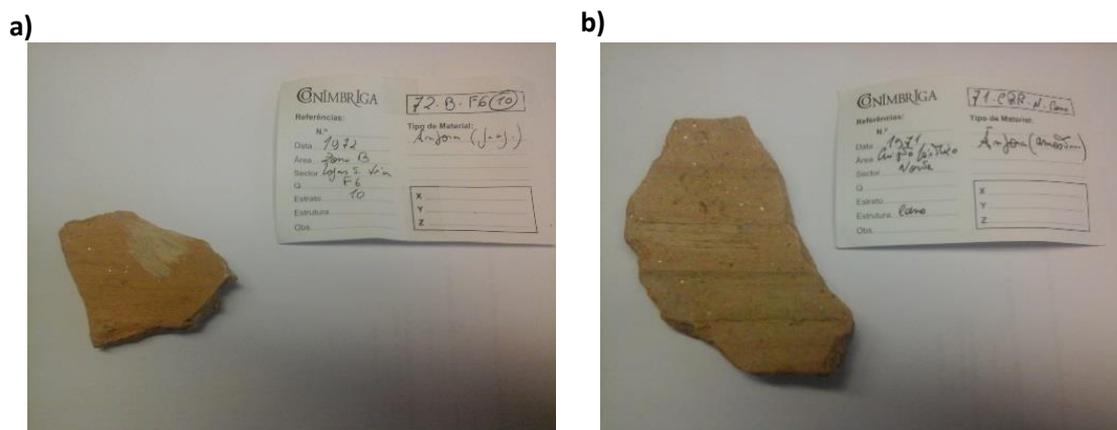


Figura 4.9 – a) Fragmento da ânfora 72.B.F6, b) fragmento da ânfora 71.CRP.N.

As pastas cerâmicas utilizadas são semelhantes às de alguma cerâmica utilitária de armazenagem produzida e utilizada em Conimbriga e, em parte, também à do material cerâmico de construção¹⁵⁸. A informação de que esta se tratará de uma produção local pode portanto tomar-se como segura.

4.3.2 – Resultados obtidos e conclusões

Na figura 4.10 apresentam-se os cromatogramas resultantes da análise aos fragmentos 71.Crip-Norte.Cano e 72.B.F6 após extração em MeOH, e na Tabela 4.5 alguns dos compostos detetados nos extratos metanólicos. Ambos os fragmentos apresentaram resultados muito semelhantes, tendo em ambos sido detetadas elevadas quantidades de ácidos orgânicos indicadores da presença de vestígios de vinho. Entre outros, verificou-se a presença dos ácidos tartárico, málico, fumárico, succínico, citramálico, azeláico, mandélico e cinâmico^{7,26,79}. Foi também confirmada a presença de compostos ligados à existência de óleos de plantas e sementes como a quercetina, oleanitrilo, licoperseno, fitol e isoeugenol^{144,150,151}. A deteção de aminoácidos é também compatível com a presença de óleos vegetais de plantas¹⁶⁰.

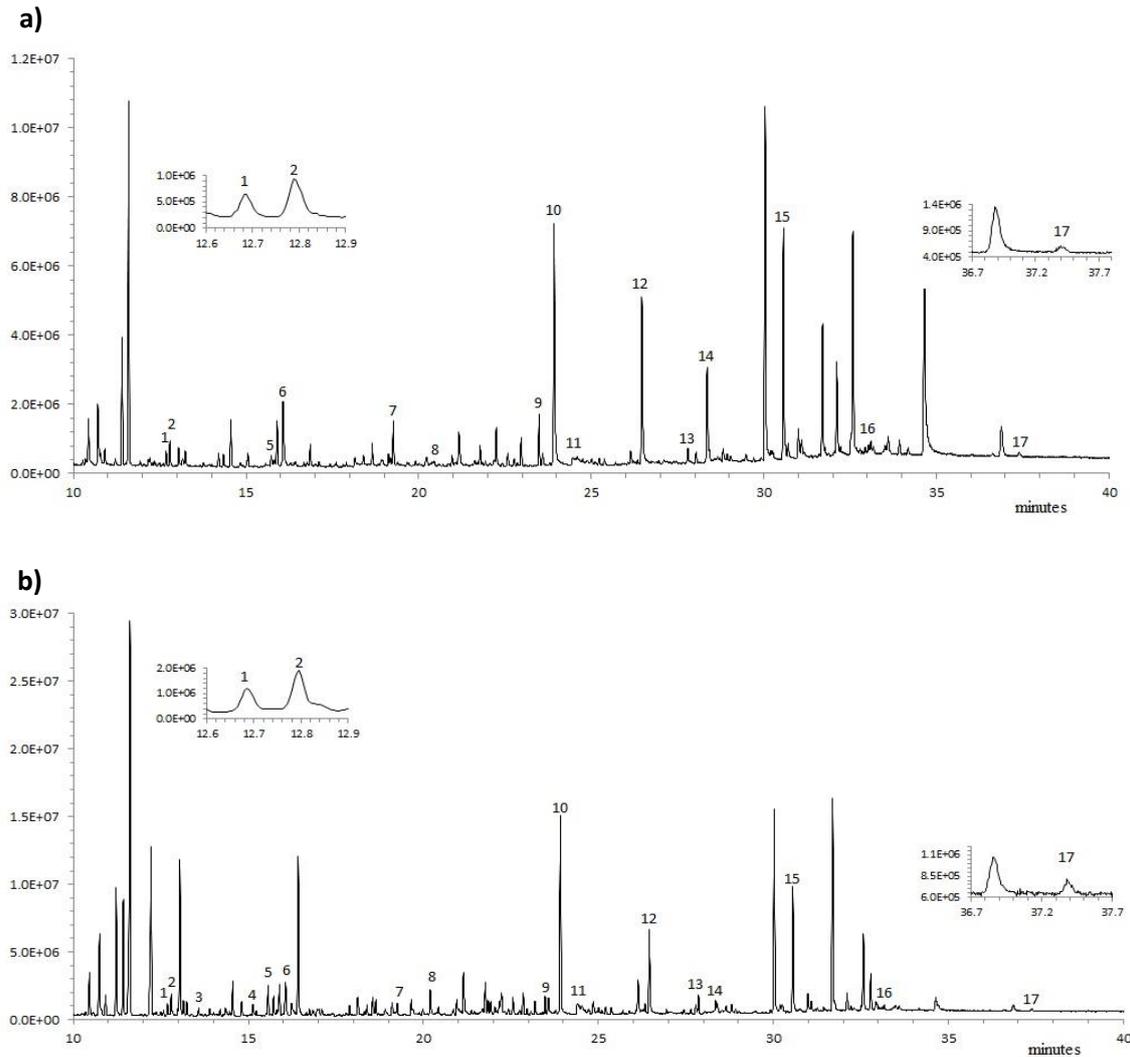


Figura 4.10 – a) cromatograma do fragmento 71.Crip-Norte.Cano; b) cromatograma do fragmento 72.B.F6 (apresenta-se a identificação dos compostos na Tabela 4.5).

A hipótese da presença de resíduos de azeitonas/azeite parece ser de excluir pela reduzida concentração de ácido oleico (ácido insaturado maioritário no azeite) quando comparado com os ácidos palmítico ou esteárico, e à ausência de compostos como o valenceno ou o α -muoroleno¹¹¹. Entre os traçadores de queima de biomassa vegetal, destaca-se não só o levoglucosano, um marcador universal na queima de madeiras ou folhagens^{108,109}, mas também os ácidos pimárico e abiético²⁶, assim como produtos da oxidação destes (ácidos desidroabiético e 7-oxo-desidroabiético) que sugerem a queima de materiais resinosos como madeiras de pinheiro²⁶. A deteção destes compostos indicia que o conteúdo da ânfora está contaminado com vestígios de “fumo” proveniente da queima de madeiras ou folhagens, pelo que o seu conteúdo terá sido aquecido ou fervido, provavelmente com as plantas ou sementes referidas.

Tabela 4.5 – Alguns dos compostos detetados nos extratos metanólicos e a sua correspondência para os cromatogramas das Figs. 4.10a e 4.10b.

Número	Composto	71.CRIP-NORTE.Cano	72.B.F6
1	Ácido tartárico	✓	✓
2	Ácido fumárico	✓	✓
3	Fitol	✓	
4	Isoeugenol	✓	
5	Ácido málico	✓	✓
6	Prolina	✓	✓
7	Levoglucosano	✓	✓
8	Ácido azeláico	✓	✓
9	Ácido palmiteláidico	✓	✓
10	Ácido palmitico	✓	✓
11	Oleanitrilo	✓	✓
12	Ácido esteárico	✓	✓
13	Ácido pimárico	✓	✓
14	Ácido desidroabiético	✓	✓
15	Ácido abiético		✓
16	Ácido 7-oxodesidroabiético	✓	✓
17	Licoperseno	✓	✓
18	Colesterol	✓	✓

Assim, após uma avaliação global dos compostos detetados pode concluir-se que as ânforas em questão terão sido utilizadas no transporte/armazenamento de um preparado de vinho aquecido com plantas e sementes, um costume ancestral bastante comum.

A identificação destas ânforas como contentores vinários permite integrá-las na corrente de intensificação da agricultura de rendimento na região de Conimbriga, de que a difusão da cultura vitivinícola fez parte e que se traduziu na rarefação muito significativa (até ao virtual desaparecimento) das ânforas vinárias importadas para a cidade ao longo dos finais do séc. I e do séc. II¹⁶¹.

4.4 – Análise a pigmentos presentes nas mamoaas de Eireira (Viana do Castelo) e de Lamas (Braga)

4.4.1 – Pequena contextualização histórica

Desde os períodos mais remotos que a “arte” é vista como sendo uma das mais brilhantes formas de comunicação. Apesar das incontáveis formas de fazer “arte”, esta é usualmente associada a pinturas, sejam elas em quadros, murais, pessoas ou quaisquer outras superfícies. Desta maneira iniciou-se desde muito cedo a procura e a aplicação de pigmentos. Assim erguem-se os curiosos casos de dois monumentos megalíticos com localizações geográficas diferentes (Figura 4.11) onde se encontraram pinturas ancestrais.

A mamoa da Eireira, localizada em Afife, Viana do Castelo foi descoberta em 1986 por Eduardo Lopes da Silva tendo identificado num dos seus esteios de cabeceira distintas quatro linhas sinuosas e vários pontos pequenos, também com pigmento vermelho (Figura 4.12a e 4.12b). Relativamente à mamoa de Lamas, pode referir-se que esta foi identificada pela primeira vez em 1993, localizando-se junto ao núcleo representativo da junta de freguesia de Lamas, Braga. Tal como a mamoa de Eireira, é um monumento megalítico funerário (Figura 4.13a). Os dois esteios estudados desta mamoa apresentam em toda a sua superfície um conjunto de linhas brancas que perfazem retângulos imperfeitos (Figura 4.13b).

4.4.2 – Resultados obtidos e conclusões

Tendo em conta que a coloração dos pigmentos encontrados nos dois monumentos megalíticos pode também dever-se à aplicação de materiais inorgânicos corados, decidiu-se complementar a utilização de técnicas cromatográficas com outras como o FTIR e o XRD, mais apropriadas à análise de materiais inorgânicos. Para isso, de cada esteio estudado foram também recolhidas alíquotas do granito sem pigmento, permitindo a realização de brancos.

Mamoas da Eireira

A análise por FTIR pode ser uma das primeiras técnicas a aplicar na detecção de compostos orgânicos em artefactos arqueológicos, já que permite despistar rapidamente da presença ou ausência de material orgânico, embora não seja particularmente informativa quanto à composição deste. Neste caso particular, da sua utilização podem resultar também algumas informações sobre o conteúdo inorgânico da amostra. Para facilitar a interpretação dos espectros experimentais (Figura 4.14), dividiu-se a sua análise em duas regiões distintas conforme a informação por eles fornecida, nomeadamente entre os 1300 e 400 cm^{-1} , uma região com informação mais relacionada à estrutura das argilas, e a região compreendida entre os 1300 e os 4000 cm^{-1} , com informação relacionada com a estrutura do pigmento¹⁶².

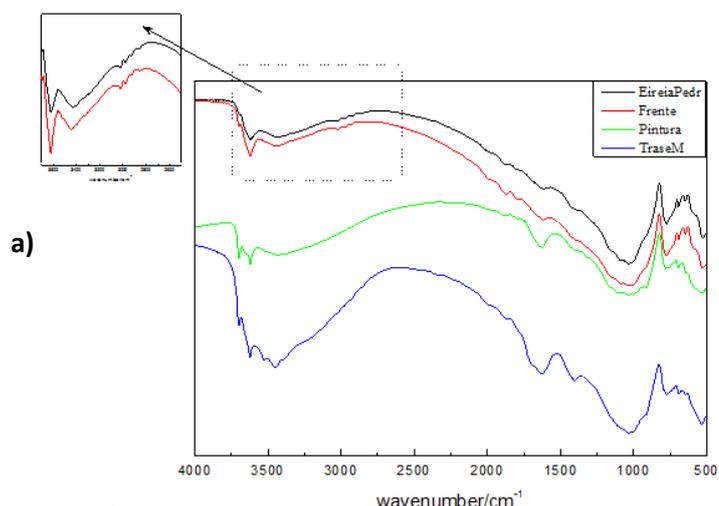


Figura 4.14.a – Sobreposição de espectros de FTIR da mamoa da Eireira: i) pigmento vermelho da linha sinuosa (linha verde); ii) granito retirado da frente da mamoa (linha vermelha); iii) granito retirado da traseira da mamoa (azul); iv) granito da parte lateral da mamoa (preto).

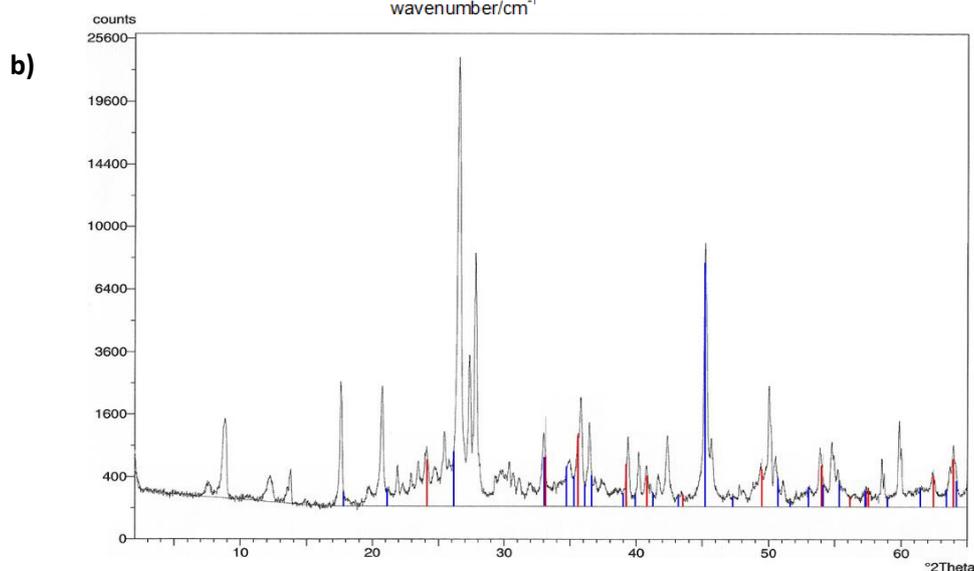


Figura 4.14.b – Difratoograma de XRD do pigmento (linhas sinuosas) da mamoa da Eireira, mostrando picos característicos da hematite (vermelho) e goetite (azul).

Foram realizadas análises tanto ao pigmento (Figura 4.14.a) como ao granito recolhido de três zonas diferentes do esteio (da frente, de trás e do lado direito do esteio), funcionando estes como referências relativamente à análise do pigmento (na raspagem do pigmento também se encontravam presentes resíduos de granito que poderiam interferir na análise). A amostra de pigmento foi também desidratada para evitar que as bandas da água mascarassem a análise. Verificou-se a existência de bandas intensas tanto aos 3600 como aos 1007 cm^{-1} , sugerindo a presença de aluminossilicatos. A banda por volta dos 3600 cm^{-1} é usualmente considerada como devendo-se à presença de grupos hidroxilo¹⁶³ enquanto o pico a 1007 cm^{-1} é devido às vibrações de alongamento Si-O e Si-O-Si¹⁶². Para além das bandas mencionadas, o espectro referente ao pigmento apresenta bandas aos 3710, 1111, 782, 684 e 645 cm^{-1} . A presença das bandas de absorção bem definidas aos 3710 e 3600 cm^{-1} é típica para a caulinite¹⁶⁴, uma argila que contrariamente ao esperado, é de cor branca e não vermelha, e as suas frequências são determinadas pela distância dos grupos OH com o oxigénio de grupos vizinhos.

Após a análise por FTIR ter sugerido a presença de caulinite (argila de cor branca) decidiu-se usar um método de análise alternativo para confirmar os resultados obtidos, recorrendo-se para isso à análise por XRD. Com a obtenção do difratograma de raio-X (Figura 4.14.b) respeitante ao pigmento presente nas linhas sinuosas da mamoa da Eireira (apresenta-se uma sobreposição de difratogramas relativos ao pigmento e ao granito), conseguiram-se retirar ilações determinantes para a compreensão da estrutura do pigmento utilizado. Os resultados indicam a presença de hematite e goetite em grandes quantidades, que acabam por ser responsáveis pela coloração vermelha das pinturas. Identificou-se também caulinite no pigmento e no granito, não sendo por isso possível aferir se esta é um dos constituintes do pigmento ou se se devida à contaminação deste por fragmentos de granito que terão sido destacados durante a raspagem do pigmento. Foi também identificada a presença de quartzo, mica, ilite e k-feldspato, cuja presença conjunta parece confirmar a contaminação do pigmento com restos de granito.

Tendo-se determinado a composição inorgânica do pigmento corado, efetuaram-se análises de GC-MS para identificar possíveis constituintes orgânicos. Nas tabelas 4.6 e 4.7 apresentam-se os compostos orgânicos mais relevantes identificados na análise

cromatográfica (Figura 4.15) às linhas sinuosas (Tabela 4.6) e pontos vermelhos (Tabela 4.7). Os compostos detetados foram agrupados de acordo com as possíveis fontes.

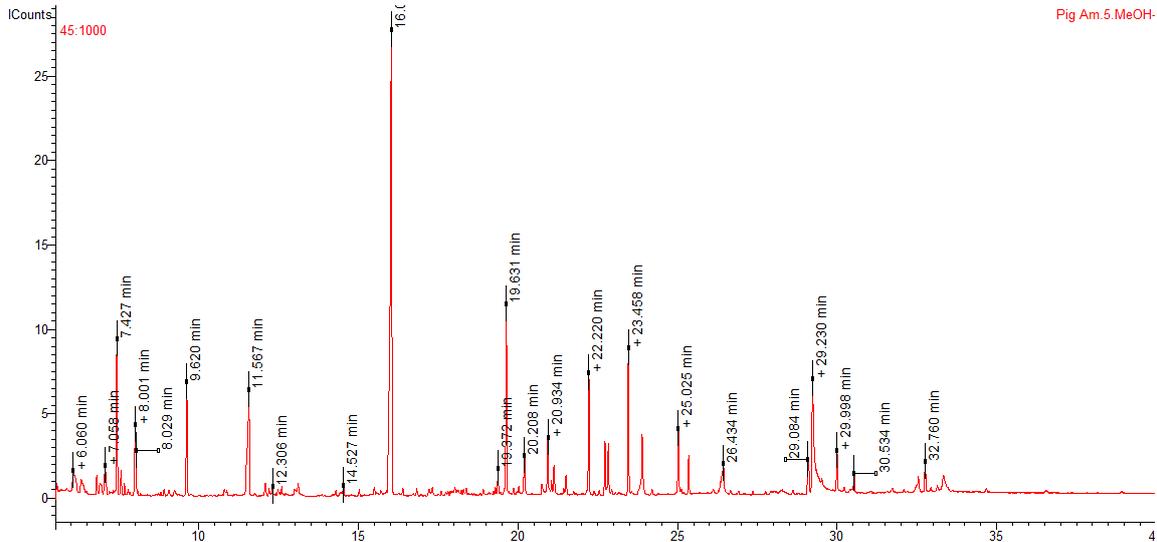


Figura 4.15 - Cromatograma resultante da análise às linhas do pigmento da mamoa da Eireira, após extração em MeOH.

Tabela 4.6 – Traçadores orgânicos identificados no pigmento vermelho presente nas linhas pintadas na mamoa da Eireira.

Algas/plantas aquáticas				
Fitol	Linalol	Vanilina	Oleanitrilo	Ácido Fitânico
9-octadecenamida	11-eicosanamida	13-docosamida	Colesterol	β -caroteno
Quercetina	Ácido palmiteláidico		β -sitoesterol	
Indicadores de queima de biomassa vegetal				
Levoglucosano	Ácido desidroabiético			

Tabela 4.7 – Traçadores orgânicos identificados no pigmento vermelho presente nos pontilhados pintados na mamoa da Eireira.

Algas/plantas aquáticas				
Fitol	Linalol	Vanilina	Oleanitrilo	Ácido Fitânico
9-octadecenamida	11-eicosanamida	13-docosamida	Colesterol	β -caroteno
Quercetina	Ácido palmiteláidico		β -sitoesterol	
Indicadores de queima de biomassa vegetal				
Levoglucosano	Ácido desidroabiético			
Traçadores de ovo				
Hexadecanonitrilo	Octadecanonitrilo	Colesterol	Alanina	Glicina

Ambas as tabelas mostram o primeiro grupo de compostos como sendo característico da presença de algas e/ou plantas aquáticas. O fitol é um diterpeno alcoólico que integra a estrutura da clorofila^{92,93}. O linalol, também um terpeno, está tipicamente presente em flores, plantas e especiarias¹⁴⁴. Oleanitrilo e a oleamida são os produtos da reação da oxidação do ácido oleico em ambiente básico¹⁴². A quercetina é um pigmento derivado de várias plantas, comumente encontrado em frutos, vegetais, grainhas e folhas¹⁵⁰. O β -sitoesterol é um esterol vegetal frequentemente encontrado em óleos vegetais¹⁵⁴. O colesterol é um esterol animal proveniente das membranas celulares, sendo por isso mesmo, muitas vezes considerado um traçador de produtos de preparados animais como carnes, óleos animais ou leite^{57,154,165}. Contudo, apesar de não ser tão abundante, pode ser encontrado em produtos marinhos. O ácido fitânico é considerado um traçador molecular para preparados piscícolas^{93,154}. As amidas 9-octadecenamida, 11-eicosenamida e 13-docosenamida são encontrados em algas e microalgas^{143,155,156}. Todos estes resultados combinados evidenciam a presença de um processamento de algas/plantas aquáticas.

O segundo grupo de compostos é representativo da queima de biomassa vegetal, particularmente os compostos levoglucosano e ácido desidroabiético. O levoglucosano é um produto da pirólise de celulose, vastamente presentes em madeira ou vegetação^{108,153}. É frequentemente usado como traçador molecular de queima de biomassa vegetal uma vez que é produzido em grande escala e é bastante estável. A presença destes dois compostos sugerem que as algas/plantas aquáticas detetadas foram expostas a altas temperaturas, pelo que terão sido cozinhadas ou apenas aquecidas, sendo sujeitas à influência de fumo.

Apenas na tabela 4.7 (relativa aos pontilhados vermelhos) é apresentado um terceiro grupo de compostos que compreendem o colesterol, hexadecanenitrilo e octadecanonitrilo. Estes compostos são marcadores de proteínas de ovos¹⁶⁶, evidenciando que estes terão tido a função de colar ou apenas juntar o pigmento (mineral) aos óleos de algas/plantas aquáticas. A deteção de aminoácidos como a alanina e glicina são compatíveis com a presença de marcadores moleculares de ovos¹⁶⁶.

Desta forma concluiu-se que para a preparação do pigmento vermelho exposto na mamoa da Eireira foram utilizados os minerais hematite ou goetite (que conferem a cor encarnada) com (provavelmente) caulinite. Estes pigmentos inorgânicos terão sido solubilizados graças a óleos de plantas aquáticas. Para prevenir da formação de uma solução demasiado aquosa e pouco viscosa ter-se-á adicionado têmpera de ovo que terá ajudado a solidificar e a fixar o pigmento. Finalmente este terá sido aquecido para se garantir a estabilidade do mesmo.

Mamoa da Lamas

Na figura 4.16 apresentam-se os espectros de FTIR do pigmento branco e do granito da mamoa de Lamas. Ambos os espectros apresentam bandas intensas aos 3600, 3435, 1630, 1007 cm^{-1} sugerindo a existência de aluminossilicatos em grandes quantidades. As bandas aos 3435 e 1630 cm^{-1} , as chamadas frequências de estiramento $\nu(\text{O-H})$ aos 3435 cm^{-1} e as bandas de deformação $\delta(\text{O-H})$ aos 1640 cm^{-1} , podem dever-se a alguma água adsorvida. A banda aos 3600 cm^{-1} é usualmente ligada à existência de grupos de hidroxilos de superfície¹⁶². A banda na região de baixa energia, com um pico máximo de 1007 cm^{-1} é, tal como no caso do pigmento vermelho da Eireira, devida a vibrações de alongamento Si-O e Si-O-Si¹⁶³. Para além das bandas mencionadas acima, o espectro do pigmento apresenta também bandas aos 3700, 1111, 782, 684 e 645 cm^{-1} . Tal como o espectro do pigmento da mamoa da Eireira, este também apresenta uma elevada concentração de picos característicos da argila caulinite (bandas de absorção aos 3710 e 3600 cm^{-1})¹⁶⁴.

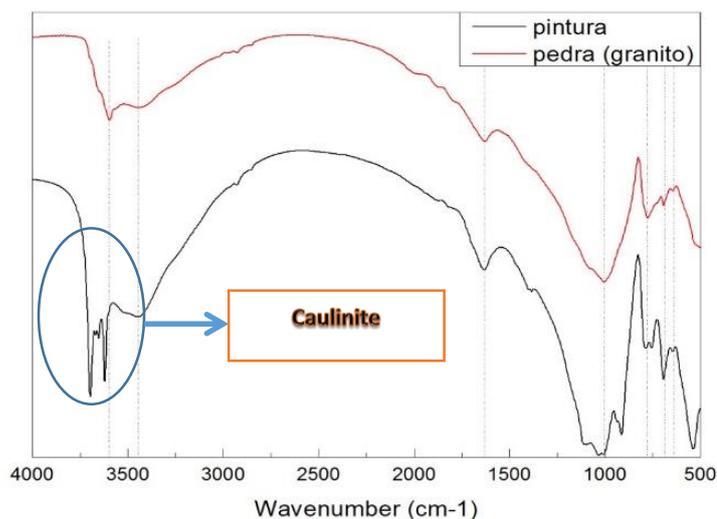


Figura 4.16 – Espectro FTIR do pigmento e do granito da mamoa de Lamas.

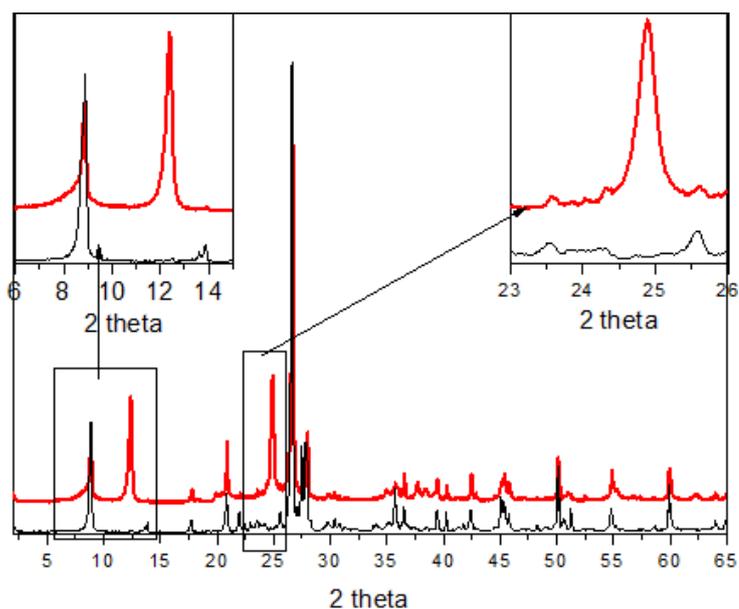


Figura 4.17 – Difratoograma de XRD do pigmento branco e granito da mamoa de Lamas.

A figura 4.17 apresenta uma sobreposição de difratogramas de XRD do pigmento e do granito da mamoa de Lamas. Os resultados indicam a presença de caulinite no pigmento sendo os seus picos típicos aos 12,4 e 25,0 cm^{-1} inexistentes no branco realizado (granito). A caulinite podem explicar a tonalidade esbranquiçada do pigmento apresentado na superfície da mamoa. É também identificada a presença dos minerais inerentes ao próprio granito, como quartzo, mica, ilite e k-feldspato.

Na tabela 4.8 são apresentados os resultados da análise cromatográfica (Figura 4.18) aos pigmentos brancos do monumento megalítico de Lamas.

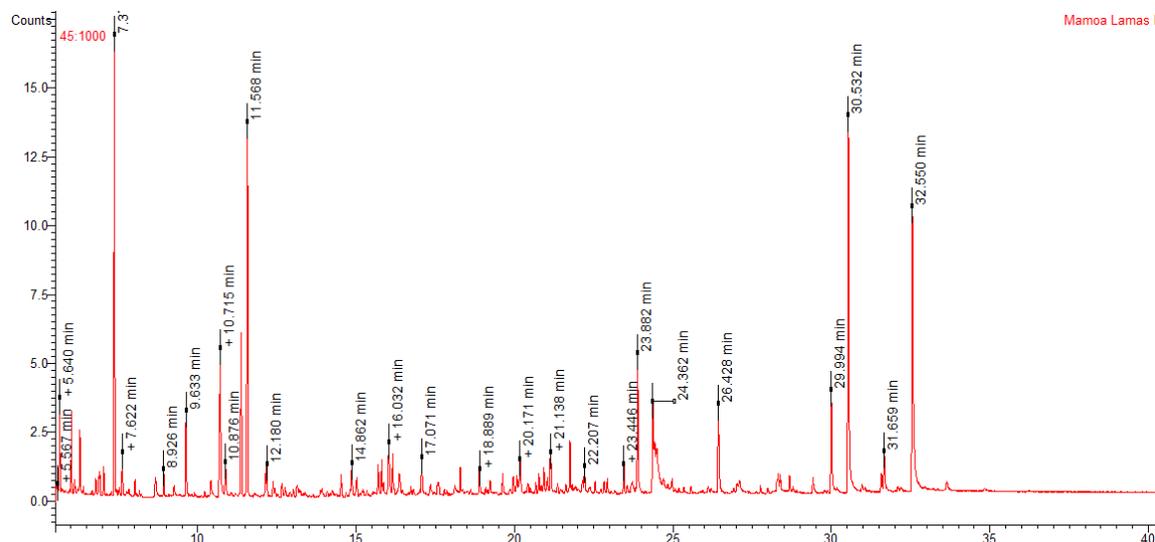


Figura 4.18 – Cromatograma relativo ao pigmento branco da mamoa de Lamas, após extração em MeOH.

No primeiro grupo são apresentados alguns compostos característicos de óleos de plantas. Tal como para a mamoa da Eireira, são também identificados compostos como o oleanitrilo, que pode provir da reação de oxidação de ácido oleico em ambiente básico¹⁴², e desta maneira, pode ser atribuído à presença de óleos vegetais. A quercetina que não está só, mas também o principal flavonoide presente na casca da cebola, muito usado como corantes têxteis na antiguidade¹⁵⁰. O β -sitoesterol, um esteroide vegetal¹⁵⁴ e o β -caroteno e licopeno, ambos pigmentos antioxidantes característicos de muitas plantas diferentes, vegetais e frutas¹⁶⁷. A deteção de marcadores de queima de biomassa vegetal pode indicar que o preparado terá sido aquecido para melhorar a sua estabilidade. Foram também detetados alguns hidratos de carbono (açúcares), provavelmente provenientes da degradação de plantas e de sementes.

Tabela 4.8 – Compostos orgânicos identificados no pigmento branco proveniente da mamoa de Lamas.

Óleos vegetais				
Quinolina	Isoquinolina	Vanilina	Oleanitrilo	Quercetina
Licopeno	Forbol	Gedunin	β-caroteno	β-sitoesterol
Etilamina	Ácido palmiteláidico	Ácido ricinoleico	Serverogenina	Glucosamina
Fitol				
Indicadores de queima de biomassa vegetal				
Levoglucosano	Ácido desidroabiético	Ácido abiético	Ácido pimárico	
Ácido pimárico	Ácido isopimárico	Oleanano		
Hidratos de carbono				
Glucose	Frutose	Sucrose	Talose	
Manose	Fucose	Lactose	Xilulose	
Inositol	Xilopirranose	Xilofuranose		

Após todos os ensaios realizados, concluiu-se que para a preparação do pigmento branco da mamoa de Lamas ter-se-á utilizado uma mistura de óleos vegetais e caulinite (uma argila mineral branca $(Al_2Si_2O_5(OH)_4)$ muito utilizada na preparação de pigmentos naturais) que terá sido estabilizado com a exposição temporária a elevadas temperaturas, para assim perdurar mais tempo.

4.5 – Potes meleiros e colmeias em cerâmica

4.5.1 – Pequena contextualização histórica

A história do mel está intimamente relacionada com o percurso da humanidade, pelo menos desde o período neolítico. Era a substância edulcorante mais utilizada, apesar de existirem outros tipos de açúcares, como os xaropes de tâmaras, de uvas e de figos, para além de extratos de algumas plantas. O mel, nas suas diferentes qualidades e usos era um bem comercializado a par de outros importantes produtos alimentares. A existência de potes destinados ao seu transporte e conservação está bem documentada pela época antiga em todo o mediterrâneo, podendo inclusivamente remontar às Primeiras Civilizações²³.

Neste estudo foram analisados potes meleiros e colmeias cerâmicas recolhidas no atual território português, nomeadamente de Braga (ínsula das Carvalheiras), Chaves, Matosinhos (Castro de Guifões), Conímbriga e Sagres (Figura 4.19). Como o mel eram utilizado na edulcoração, conserva de carnes, rituais funerários e embalsamentos, medicina, etc., o estudo destes potes desempenhe representam parte da tarefa impossível de determinação da função empregue ao produto em questão originalmente^{23,95,100}.

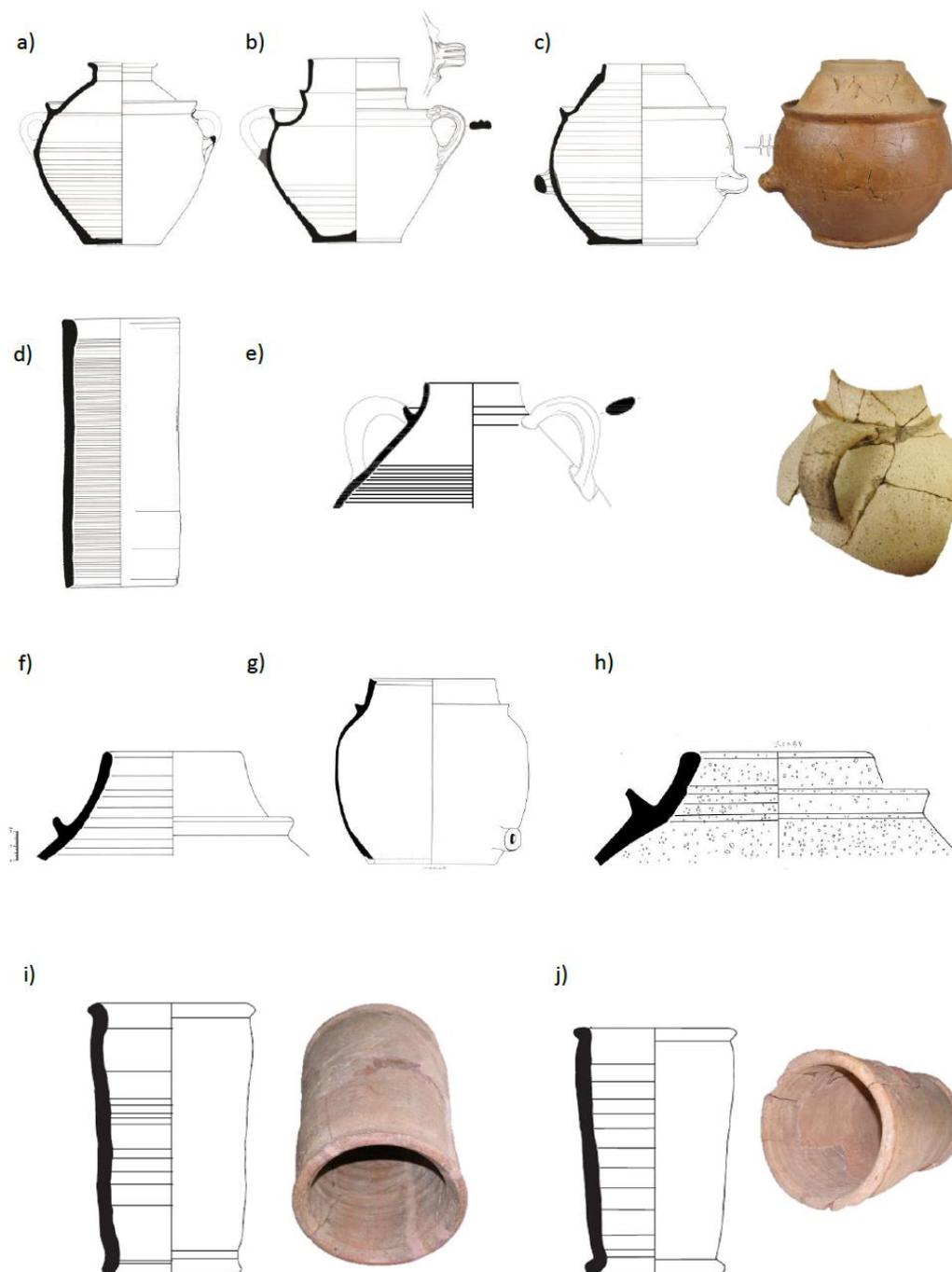


Figura 4.19 – i) Braga – *ínsula* das Carvalheiras (a – d); ii) Chaves (e); iii) Matosinhos – Castro de Guifões (f); iv) Conímbriga (g, h); v) Sagres – centro oleiro do Martinhal (i, j).

O mel contém cerca de duzentas substâncias diferentes, apresentando elevadas quantidades de monossacarídeos como a frutose, glucose e sacarose e quantidades menores de dissacarídeos, trissacarídeos e tetrassacarídeos; cerca de 0,57% de ácidos orgânicos como o glucónico, resultante da digestão enzimática da glucose, pirúvico, málico, cítrico, succínico e fumárico; minerais; vitaminas; proteínas; aminoácidos como a prolina (dominante); lípidos e compostos fenólicos como o gálico, p-cumárico, cafeico, elágico, ferrúlico, clorogénico, siríngico, cinâmico, vanílico e p-hidroxibenzóico. Um dos compostos característicos do mel é o hidroximetilfurfural que é formado tanto pela desidratação da hexose em meio ácido como por reações entre os aminoácidos ou proteínas e os hidratos de carbono. As temperaturas elevadas ou armazenamentos prolongados podem aumentar o nível de hidroximetilfurfural no mel.

4.5.2 – Resultados obtidos e conclusões

Na figura 4.20 apresenta-se um cromatograma típico relativo à extração com MeOH do fragmento cerâmico pertencente ao um pote meleiro da ínsula das Carvalheiras, em Braga.

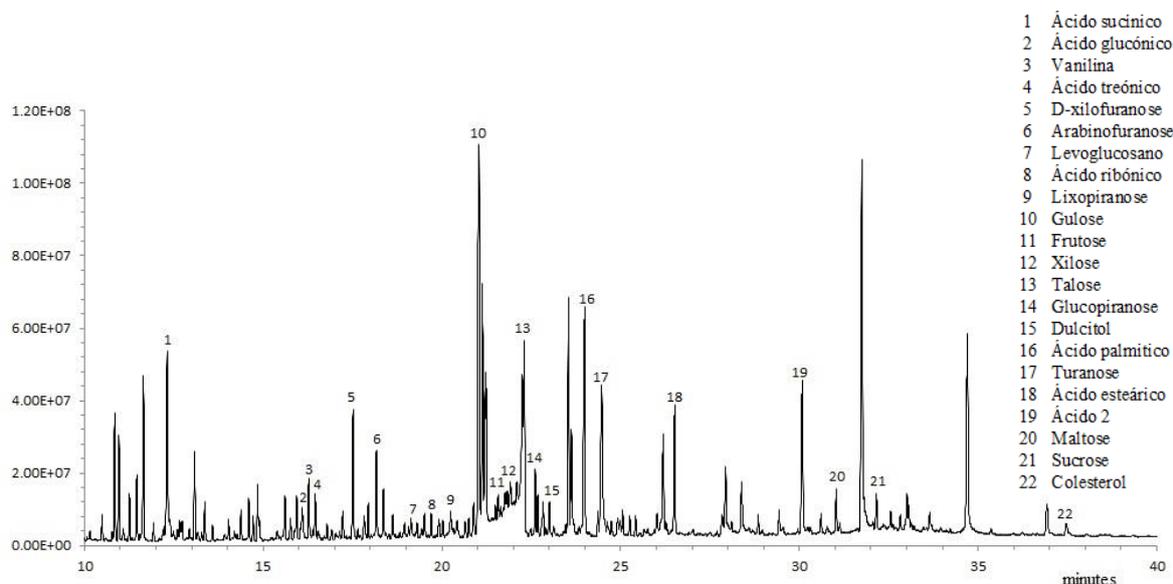


Figura 4.20 – Cromatograma típico relativo à análise efetuada a um pote meleiro proveniente de Braga.

Os **hidratos de carbono** foram o grupo de compostos orgânicos detetados com intensidades relativas mais elevadas, particularmente os monossacarídeos como a frutose, glucose, talose e xilose, e quantidades inferiores de dissacarídeos como a sucrose, lactose ou galactopiranosose^{95,97,98,99,100}. A presença abundante destes hidratos de carbono nos resíduos orgânicos parece indiciar a existência de produtos açucarados como o mel. De facto, esta hipótese é reforçada pela deteção de um composto muito característico do mel antigo e desidratado, o 5-hidroximetilfurfural^{96,100}. Esta conclusão é fortalecida pela deteção de pequenas quantidades de **aminoácidos** comumente presentes no mel, como a prolina e lisina (não assinaladas no cromatograma)^{99,100}. A queima de materiais celulósicos como a madeira, ramos ou folhagens liberta para a atmosfera compostos químicos característicos. A presença de compostos como o levoglucosano¹⁰⁸ ou os ácidos abiético, desidroabiético ou 7-oxodesidroabiético²⁶ nos materiais cerâmicos em estudo parece não se enquadrar na utilização destes contentores enquanto potes meleiros ou colmeias cerâmicas. Contudo, a contaminação do mel com compostos provenientes da queima de biomassa vegetal pode ser facilmente compreendida se se atender ao processo de extração e recolha do mel. De facto, ainda nos nossos dias é vulgar fumigar-se as colmeias para acalmar as abelhas e as afastar, de forma a permitir um acesso mais seguro ao mel. Na altura, esse fumo seria produzido pela queima de biomassa vegetal como madeiras e folhagens, de preferência ainda verdes, resultando desta operação a libertação de compostos químicos indicadores da queima efetuada. Estes acabam por impregnar-se no mel extraído, contaminando-o^{23,108}.

O colesterol é um lípido esteroide cuja presença é normalmente associada a resíduos de alimentos de origem animal. Algumas das amostras estudadas apresentaram resíduos deste composto, sendo aparentemente incompatível com a utilização destes contentores enquanto potes meleiros ou colmeias cerâmicas. Esta deteção foi inicialmente atribuída a contaminação pós-deposicional ou à manipulação indevida dos fragmentos cerâmicos após desenterramento e limpeza. Uma análise das diferentes formas das colmeias ancestrais e modernas (a forma ancestral é tubular enquanto a moderna é uma caixa com quadros de alça) permitiu concluir-se da existência de diferentes procedimentos para a extração do mel. De facto, usando-se colmeias de caixa as alças são retiradas no período de cresta com perturbações reduzidas do

enxame, minimizando a interação com as abelhas obreiras e a abelha rainha. Na antiguidade, a forma tubular das colmeias provocaria a necessidade de espremer as colmeias para delas se retirar o mel (inclusive com a ajuda de água quente) matando neste processo parte das abelhas e larvas ainda no seu interior. Neste processo, o colesterol proveniente do corpo dessas abelhas e larvas contaminaria o mel crestado.

Para além dos grupos de compostos já apresentados, o pote meleiro proveniente de Chaves (cromatograma não apresentado) exibiu um grupo de compostos designados de **terpenóides** onde se inclui o longipineno, neocloveno, cembreno, norabietano e a ionona¹¹⁰. A deteção destes compostos é compatível com a presença de resinas ou de ceras tradicionalmente utilizadas na impermeabilização de contentores cerâmicos para o transporte de líquidos¹⁶⁸. De facto, o pote estudado apresenta na sua face interior um extenso depósito de material orgânico de origem aparentemente resínica, tendo sido aplicado para a impermeabilização da cerâmica²⁶. Trata-se de compostos orgânicos pouco solúveis em meio aquoso, justificando-se a sua grande abundância por serem dificilmente lixiviados. A ausência de compostos como o reteno ou os ácidos abiético²⁶ e pimárico parece indicar não se tratar de resina de pinheiro mas sim de cera de abelha ou mesmo de própolis. De facto, estes exsudados da abelha são materiais lipofílicos, sendo sólidos e quebradiços enquanto frios mas líquidos e flexíveis depois de aquecidos, o que permitiria realizar facilmente a operação de impermeabilização das pastas porosas do contentor²⁶.

4.6 – Candela romana e lucernas egípcias

4.6.1 – Pequena contextualização histórica

As lâmpadas de cerâmica eram usadas desde 3000 a.C. até à descoberta da luz elétrica no século dezanove, tanto como meio de luz artificial como em contextos simbólicos. Este tipo de iluminação, que usualmente requeria como combustível a utilização de gorduras animais ou vegetais, acompanhou a civilização humana sempre com um carácter de enorme importância, quer pela sua utilidade, quer pelo seu significado como fonte de um elemento essencial à vida humana, a luz.

Neste trabalho foram estudadas quatro lâmpadas de diferentes tipologias - uma candela romana e três lucernas egípcias:

Candela romana – Das escavações de *Bracara Augusta* foram resgatados vários exemplares de candelas romanas, outrora utilizados para iluminação particular. Neste trabalho é apresentada uma análise a uma única peça (Figuras 4.21a e 4.21b) proveniente da escavação das Carvalheiras, Braga¹⁷ (Figura 4.22 e Tabela 4.9).

Lucernas egípcias – As três lucernas cerâmicas (Figuras 4.23a, 4.23b e 4.23c) são parte da Coleção Egípcia doada à universidade do Porto em 1927 pelo *Berlin State Museum* em compensação pelo retorno da coleção de artefactos da Mesopotâmia à Alemanha que terá sido mantida em Lisboa aquando a apreensão do navio Alemão “Cheruskia” durante o início da Primeira Guerra Mundial. A origem geográfica das três lucernas é desconhecida. As lucernas das figuras 4.23a e 4.23b apresentam-se em “D”, com motivos geométricos, sendo datados entre os séculos I e II d.C. A lucerna da figura 4.23c integra um desenho de um sapo, e é datada entre os séculos III a IV d.C. As suas análises e resultados são evidenciadas na figura 4.24 e tabela 4.10 (são apresentados os resultados da lucerna 40.01.82 devido à similaridade de resultados entre todos).

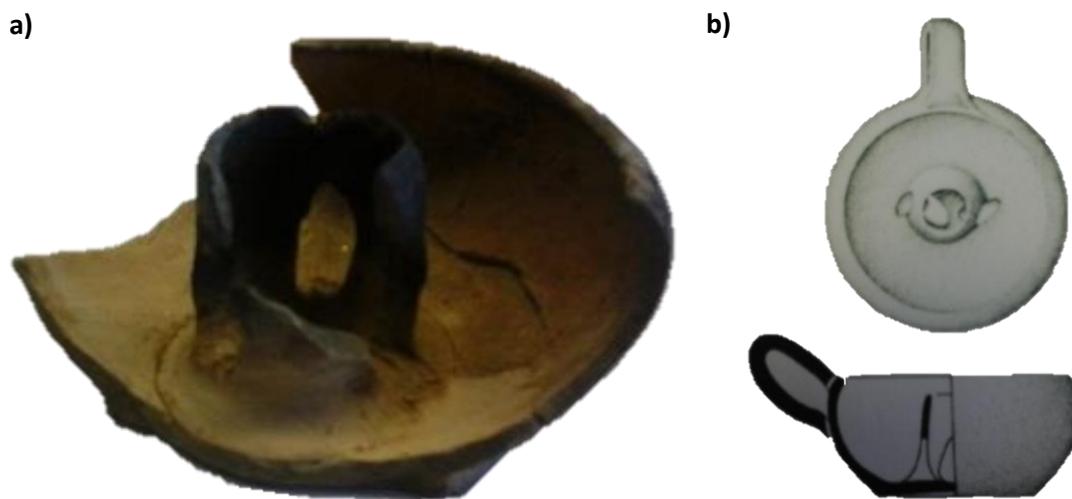


Figura 4.21 – a) Candela 2003-0421 estudada, b) Desenho da candela 2003-0421 estudada.

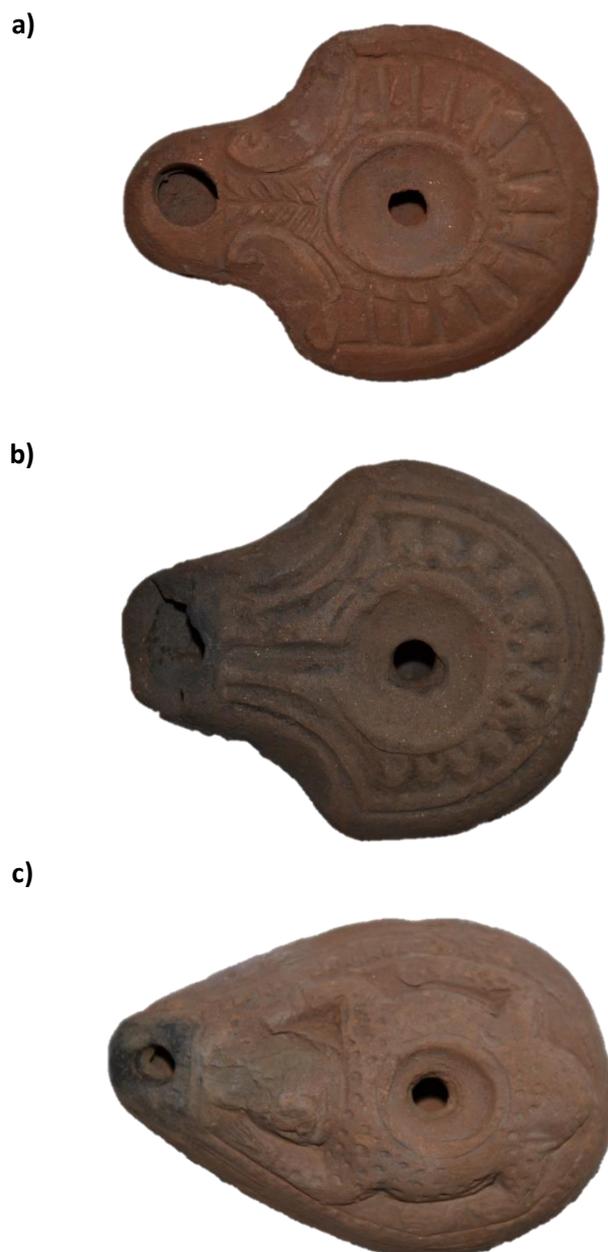


Figura 4.23 – a) Lucerna 40.01.81 estudada, b) Lucerna 40.01.82 estudada, c) Lucerna 40.01.83 estudada

4.6.2 – Resultados obtidos e conclusões

Da análise efetuada à **candela romana 2003-0421** pode retirar-se as seguintes conclusões:

A análise cromatográfica ao extrato metanólico da candela romana 2003-0421 permitiu detetar uma elevada quantidade de compostos químicos cuja presença é normalmente relacionável com vestígios de óleos vegetais, supostamente usados como

combustível. Naquela época o azeite seria um combustível comum devido à sua abundância e baixo preço^{57,111,112,114}, exibindo o respetivo cromatograma elevadas quantidades de ácido oleico, um dos seus principais constituintes. A identificação de açúcares e marcadores de queima de biomassa vegetal corrobora a hipótese da queima de compostos de origem vegetal¹⁰⁸.

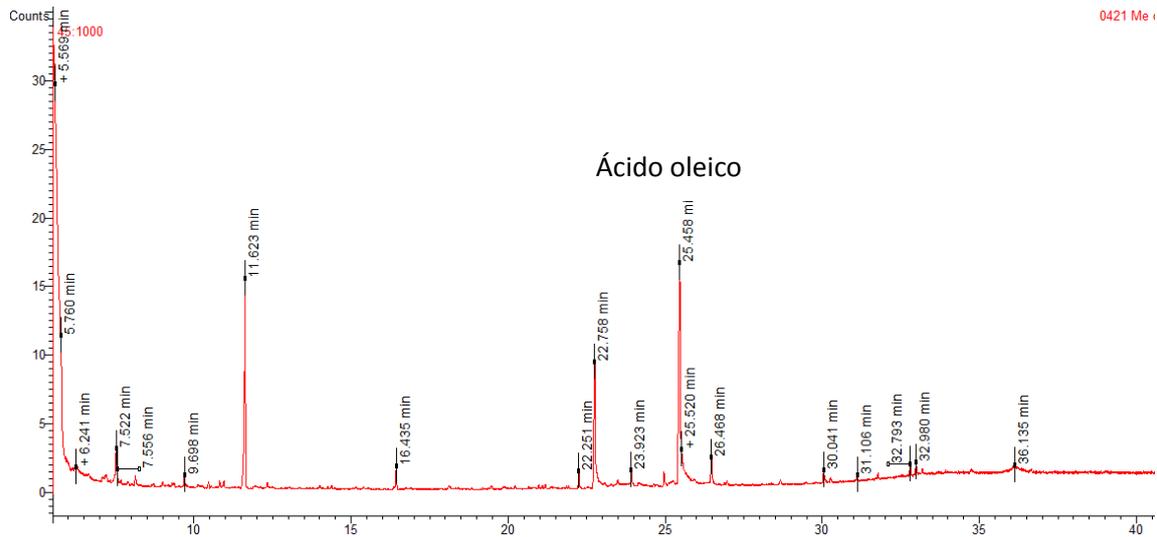


Figura 4.22 – Cromatograma relativo ao extrato orgânico da candela 2003-0421 após extração com MeOH.

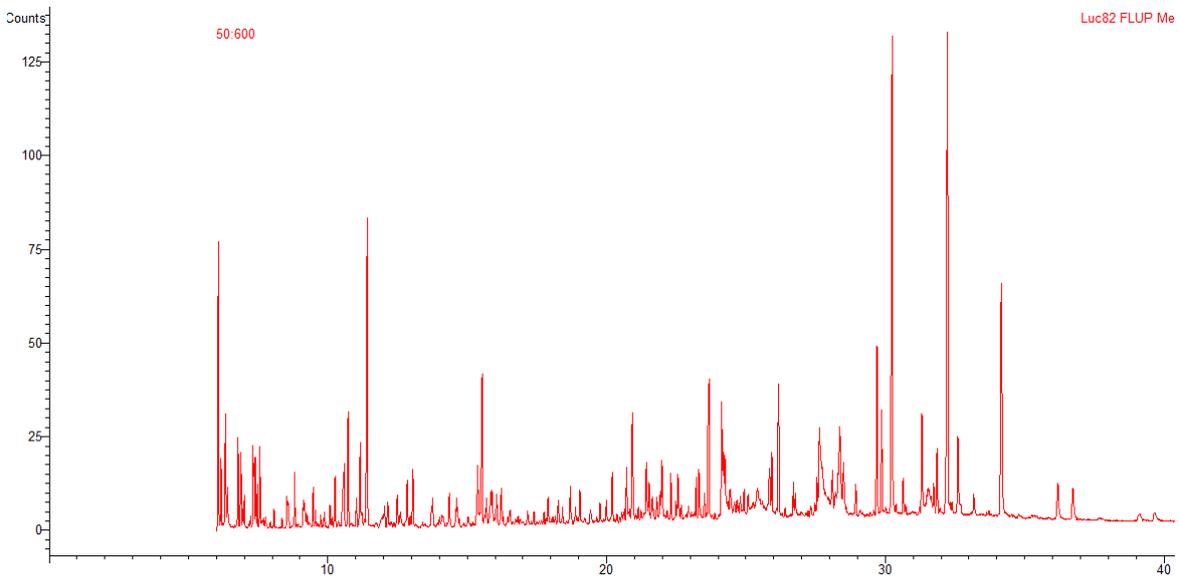


Figura 4.24 – Cromatograma relativo ao extrato orgânico da lucerna 40.01.82 após extração com MeOH.

Tabela 4.9 - Compostos orgânicos identificados na análise à candela 2003-0421.

Indicadores de óleos vegetais				
Ácido palmítico	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido esteárico	Ácido mirístico
Ácido fítico	β -sitoesterol	Oleanitrilo	Esqualeno	β -caroteno
Licopeno	Eugenol	Vanilina	Oleamida	Triacilgliceróis insaturados
Hidratos de carbono				
Fucose	Galactopiranoside	Manose	Xilulose	
Sucrose	Glucose	Frutose		
Indicadores de queima de biomassa vegetal				
Levoglucosano	Ácido desidroabiético	Ácido abiético		

Tabela 4.10 - Compostos orgânicos identificados na análise à lucerna 40.01.82.

Ácidos orgânicos				
Ácido fumárico	Ácido málico	Ácido azeláico	Ácido cítrico	Série homóloga dos ácidos alcanóicos (C ₉ -C ₂₈)
Indicadores de óleos vegetais				
Oleanitrilo	Oleamida	Jupineno	Ácido ricinoleico	Quercetina
Serverogenina	Ergosterol	Ácido oleico		
Hidratos de carbono				
Fucose	Galactopiranosida	Manose	Xilulose	
Sucrose	Glucose	Frutose		
Indicadores de queima de biomassa vegetal				
Levoglucosano	Ácido desidroabiético	Ácido 7-oxodesidroabiético		

Das análises efetuadas às três **lucernas egípcias**, sumarizadas na tabela 4.10, podem retirar-se as seguintes conclusões:

Foram detetados compostos derivados da queima de biomassa vegetal, como o levoglucosano, que é libertado para a atmosfera durante a degradação térmica de celulose^{108,109,153} e os ácidos desidroabiético e 7-oxodesidroabiético, produtos de oxidação do ácido abiético, que é obtido por aquecimento de resinas de *Pinaceae*²⁶.

O oleanitrilo e oleamida, produtos da degradação do ácido oleico¹⁴⁴, também detetado (C_{18:1}). O jupineno, um composto originado do α -pineno, um composto característico de coníferas como *Pinaceae*¹⁴⁴. A identificação de compostos fitoquímicos

como a quercetina e serveronenina, que derivam de plantas, usualmente detetados em frutas, vegetais e folhas^{142,146}. Também a ergosterol, um esteroide reconhecido em óleos vegetais¹⁴⁴.

Os ácidos orgânicos detetados, como os ácidos málico, azelaico, cítrico e fumárico, assim como a série homóloga de ácidos lineares alcanóicos, desde o C₉ até ao C₂₈, com especial ênfase para o ácido palmítico (C₁₆) e ácido esteárico (C₁₈), compatíveis com a presença de sementes ou óleos vegetais¹⁴⁶, indicando que o combustível utilizado nestas lâmpadas, seria um óleo vegetal.

Pode-se descartar a utilização de azeite, contrariamente à análise à candela romana, devido à baixa abundância de ácido oleico (C_{18:1}) quando comparado ao ácido esteárico (C₁₈), o correspondente ácido saturado⁵⁷.

4.7 – Ânforas de produção lusitana

4.7.1 – Pequena contextualização histórica

O período de Augusto assinala uma forte mudança nas estruturas económicas e comerciais à escala do Império. A esta realidade não ficou alheia a província da Lusitânia que desde cedo, juntamente com outras províncias ou mesmo cidades romanas, se tornou um dos maiores exportadores de preparados piscícolas, como testemunham os vários centros de produção e as olarias destinadas ao fabrico de ânforas (Figura 4.25)³⁹. São bem conhecidas as ânforas fabricadas em distintos centros produtores situados ao longo da fachada atlântica, particularmente as de fabrico lusitano tradicionalmente associadas ao transporte de preparados piscícolas³⁹.

4.7.2 – Resultados obtidos e conclusões

Neste estudo apresentam-se os resultados da análise a fragmentos de quatro ânforas lusitanas (Figura 4.26), nomeadamente uma ânfora ovoide, uma similar a uma Dressel 7-11 e duas Dressel 14. Apesar de todos os fragmentos terem sido estudados separadamente, optou-se por organizar os resultados numa única tabela de compostos orgânicos (Tabela 4.11) atendendo à similaridade entre os resultados obtidos (Figura 4.27).



Figura 4.25 – Principais centros produtores de cerâmicas ao longo da costa Atlântica.

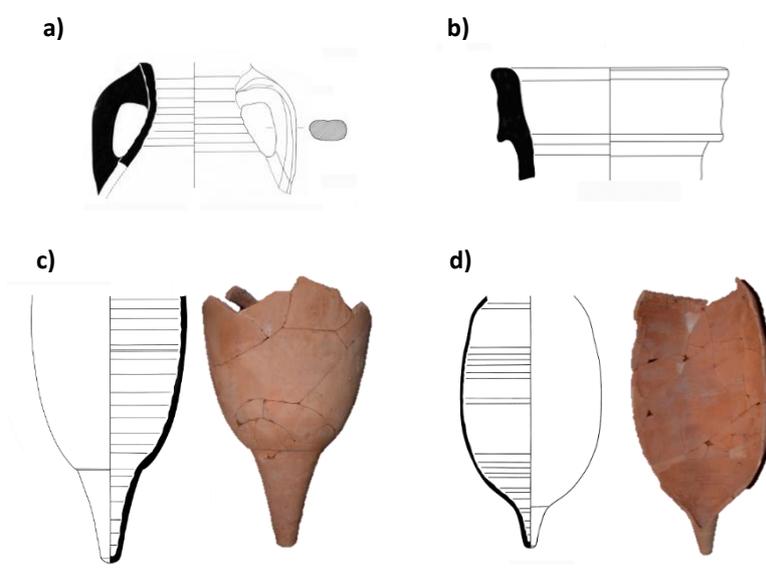


Figura 4.26 – Ânforas Lusitanas estudadas: a) ovoide de castro de Vigo, Pontevedra, Espanha; b) Lusitana de Peniche, afim à Dressel 7-11, nº 1997-1031; c) Lusitana Dressel 14, nº 1997-0451; d) Lusitana Dressel 14, nº 1997-0315.

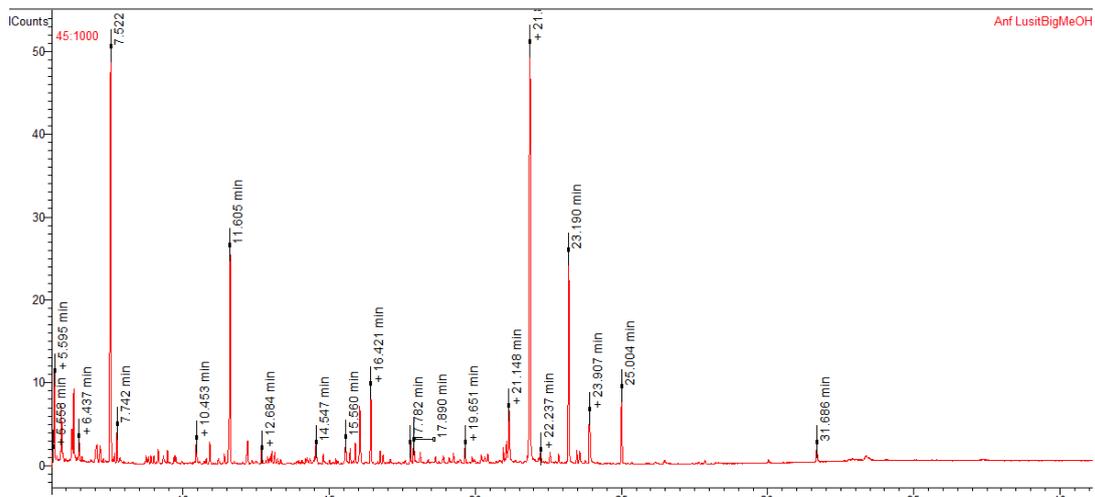


Figura 4.27 – Cromatograma relativo ao fragmento de ânfora Lusitana Dressel 14 1997-0315 após extração com MeOH.

Tabela 4.11 – Organização dos compostos mais relevantes da análise das ânforas lusitanas estudadas.

Ácidos orgânicos				
Lático	Sucínico	Tartárico	3-oxovalérico	Cinâmico
Treónico	Málico	Azeláico	Fumárico	Isovanílico
Série homóloga de ácidos alcanóicos lineares C ₈ -C ₂₄				
Hidratos de carbono				
Frutose	Galactofuranose	Glucitol	Gulose	Inositol
Maltose	Sucrose	Talose	Xilofuranose	Altrose
Aminoácidos				
Prolina	Glicina	Lisina	Alanina	
Queima de biomassa vegetal				
Levoglucosano	Acido desidroabiético		Acido 7-oxodesidroabiético	
Ácido 15-hidroxi-7-oxodesidroabiético				
Óleos vegetais				
Isoeugenol	Oleanitrilo	Oleamida	Estigmasterol	Germacrano
Germanicol	Quercetina			
Restos de peixe				
Colesterol	Ácido oleico (C18:1, ω9)	Ácido palmiteláidico (C16:1 cis-9, ω7)	Ácido palmitoleico (C16:1 trans-9, ω7)	
Ácido linoleico (C18:2, ω6)	Ácido fitânico	Ácido vacénico (C18:1 trans-11, ω7)	Ácido erúcido (C22:1, cis 13, ω9)	
Fitol	Ácido linolénico (C18:3, cis 9,12,15, ω3)	Ácido eicosadienóico (C22:2, cis-11,14, ω6)		

Os resultados analíticos entre as ânforas estudadas foram muito similares, revelando logo à partida que terão tido a mesma função primordial. A presença de compostos como o colesterol, fitol, ácido fitânico, vários ácidos-ómega e do ácido eicosadienóico com ênfases veemente assinaladas, atribuem o indubitável ideal da ancestral existência de preparados piscícolas¹⁵⁴. O facto de todas as amostras serem ricas em hidratos de carbono, revela que os produtos terão sido adocicados artificialmente através da adição de mel ou algo similar^{39,100}. Os marcadores biológicos de óleos vegetais como isoeugenol¹⁴⁴, oleanitrilo, oleamida¹⁴², germacrano ou germanicol¹⁵⁴, indicam, por sua via, a adição de plantas ou ervas aos preparados. Os aminoácidos corroboram esta hipótese pois encaixam no processo de hidrólise de proteínas de peixe^{140,141}. A existência de marcadores de queima de biomassa vegetal

sugerem que os produtos armazenados terão em algum momento estado sujeitos à influência de fumos (cozinhados de alguma forma)^{108,153}.

As informações recolhidas perante estas análises apontam para uma correspondência com relatos de autores como *Plínio (HN XXXI 95)* quando se refere a *Melligarum/Mellogarum* e, indiretamente, a *Apício (De re coq. 1,8)* quando menciona que preparados piscícolas de menor qualidade apresentavam cheiros nauseabundos, contrariamente aos produtos de boa qualidade à base de sangue de cavala. Por essa razão, era necessária a camuflagem desse odor utilizando uma receita à base de fumigação com louro, cipreste ou mel.

4.8 – Ânforas de produção de Lugo (Espanha)

4.8.1 – Pequena contextualização histórica

A problemática do transporte de preparados piscícolas não se esgota nas ânforas de produção lusitana, já que são conhecidas outras áreas produtoras de preparados piscícolas fora desta província, designadamente na área costeira do *conventus bracarenensis*, como as ânforas de Bueu que nos últimos anos têm sido motivo de estudo. A estas acrescente-se ainda outro tipo de contentores de fundo plano, presentes em muitas estações arqueológicas, que encerram problemáticas diferenciadas consoante os locais de produção.

O consumo de crustáceos e frutos do mar pelas populações costeiras remonta à Pré-história. Os romanos apreciavam sobretudo o mexilhão (*Mytilus galloprovidencialis*) e as ostras (*Ostrea edulis*)¹⁶⁹. Nas escavações de Lugo têm-se encontrado quantidades consideráveis de restos de moluscos datáveis da primeira metade do século. I e até finais do século. IV, destacando-se as conchas de ostras e búzios que muito provavelmente provinham da costa cantábrica seguindo as rotas comerciais interiores de *Lucus Augusti* com *Brigantium*, a costa de Lugo ou a comunicação de *Iria Flavia* (Figura 4.28)¹⁷⁰. Estes produtos eram normalmente conservados frescos para consumo posterior ou transportado a longas distâncias. Dado que as ostras podem viver vários dias fora da água e o percurso de Lugo ao mar ronda os 70 km, este poderia ser coberto em apenas 3 dias de viagem a pé ou em menos que 24h a cavalo, sendo por isso de admitir que estes contentores fossem utilizados no transporte de moluscos vivos¹⁷⁰.

Neste contexto foram estudados fragmentos de seis ânforas de fundo plano provenientes de Lugo (Figura 4.29), com o intuito de se avaliar se estas teriam a mesma função que as suas homólogas Lusitanas.

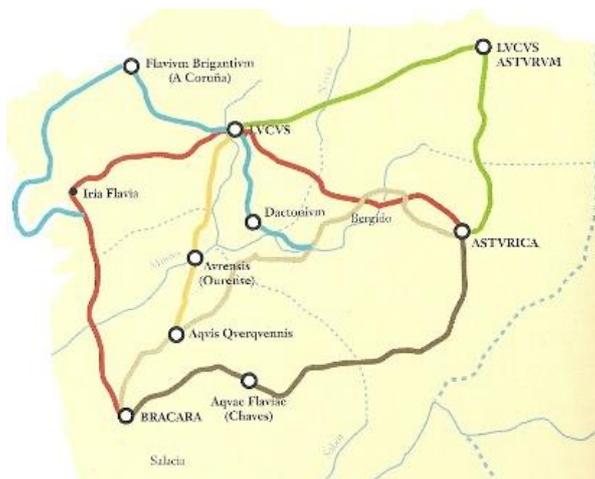


Figura 4.28 - Vias romanas da Gallaecia no alto império

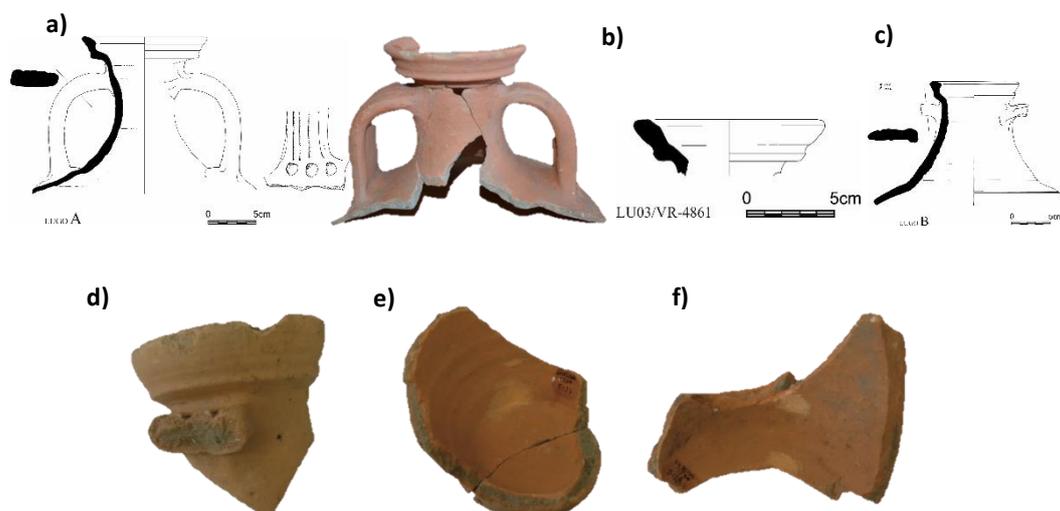


Figura 4.29 – Fragmentos de ânforas estudadas: a) ânfora “A”; b) ânfora “B”; c) ânfora “C”; d) ânfora LU03-NR5133; e) ânfora LU03-VR4861; f) ânfora LU03-VR5138.

4.8.2 – Resultados obtidos e conclusões

Na figura 4.30 apresenta-se um cromatograma típico da análise a um fragmento cerâmico de uma ânfora de Lugo. Os compostos como o isolongifoleno, cipereno, valenceno, β -elemeno, γ -neocloveno e α -patchouleno são compostos característicos de óleos essenciais, sendo o levoglucosano um traçador para a queima de biomassa^{26,108}. A

presença dos ácidos pimárico e isopimárico, e das espécies diterpênicas como os ácidos abiético, desidroabiético, 7-oxo-desidroabiético e 15-hidroxi-7-oxo-desidroabiético, compostos típicos da oxidação de resinas da família *Pinaceae*²⁶ mostra que estas ânforas foram impermeabilizadas com um revestimento interno de resina. Este procedimento é usualmente aplicado na preservação e transporte de líquidos.

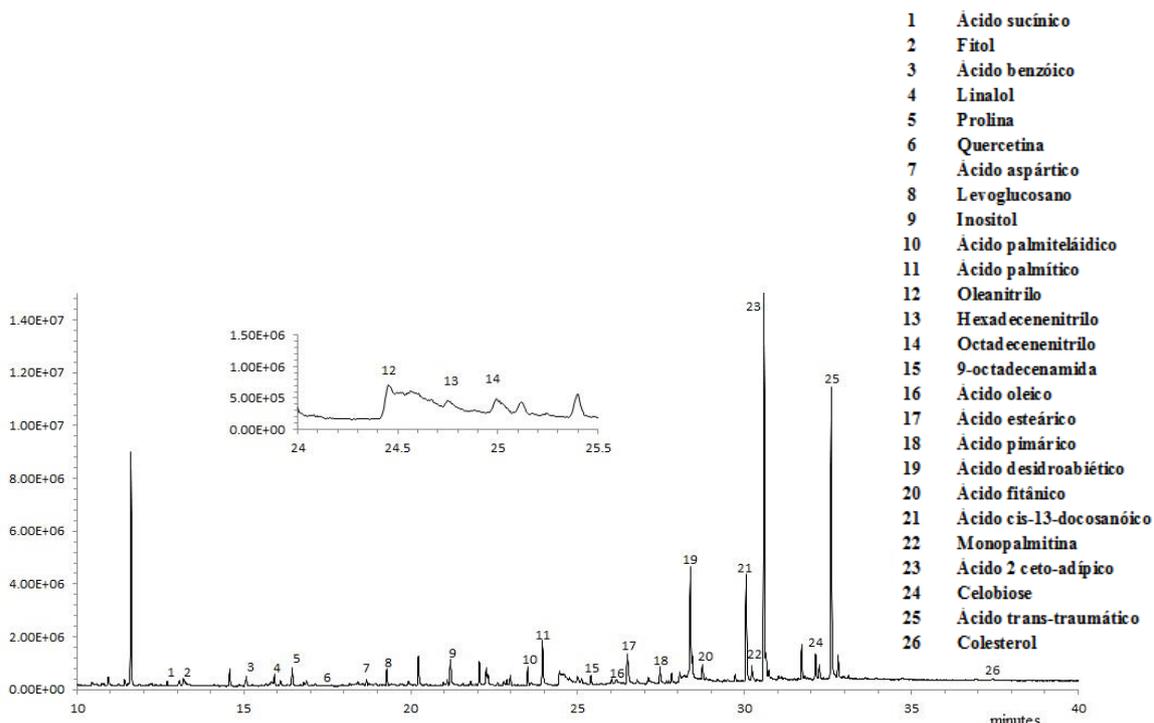


Figura 4.30 – Cromatograma típico da análise a um fragmento cerâmico de uma ânfora de Lugo.

Produtos lácteos frescos, gorduras animais e vários óleos vegetais são ricos em triacilgliceróis. A extensa degradação de triacilgliceróis resultam em monopalmitina e monoestearina que foram detectados, como pode ser observado no cromatograma da figura 4.30.

O mesmo cromatograma informa sobre a presença de compostos como o hexadecenitrilo, octadecenitrilo, colesterol e seus produtos de oxidação, como 5 β -colestano-3-ona. A combinação destes compostos é um marcador para os resíduos de material proteico a partir de um ovo inteiro e/ou gema de ovo¹⁶⁶. A origem destes resíduos nos vasos estudados permanecem ainda por explicar.

A detecção de linalol, fitol, quercetina, estigmasterol, germanicol e oleanitrilo, revela vestígios de óleos vegetais¹⁴², enquanto o 9-octadecenamida sugere a presença de ervas ou de micro-algas^{143,155,156}. Essas evidências, combinado com a detecção de ácido fitânico^{92,93,154}, indicam uma origem marinha para o conteúdo das ânforas do Lugo. No entanto, a ausência de ácidos ômega de cadeia longa como o erúcico ou o eicosadienóico parece não suportar a hipótese do conteúdo ser peixe ou preparados piscícolas^{88,90}.

Considerando-se uma origem marinha (excluindo-se a hipótese de serem peixes ou preparados piscícolas) para o conteúdo das ânforas e combinando-se a proximidade à costa da Cantábria com a existência de escavações de grandes quantidades de marisco em Lugo, datadas entre a primeira metade do século I até no final do século IV, surgiu a hipótese destas, terem transportado moluscos.

Para esclarecer algumas das dúvidas levantadas por resultados anteriores, a composição de algumas amostras de moluscos galegos foi estudado, recorrendo-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A figura 4.31 apresenta os resultados analíticos de uma amostra de berbigão comum (conservado em salmoura) da costa da Galiza, onde se distingue claramente, como maior pico, o colesterol e vários de seus produtos de oxidação, além de enormes quantidades de derivados de amins e amidas.

Estes resultados estão de acordo com os dados anteriormente obtidos para as amostras Lugo, nomeadamente:

- i) A origem marinha para ambos, os derivados de amida e amina detetados, e
- ii) a origem marinha do colesterol detetado que, como pode ser observado, é o pico mais intenso do cromatograma.

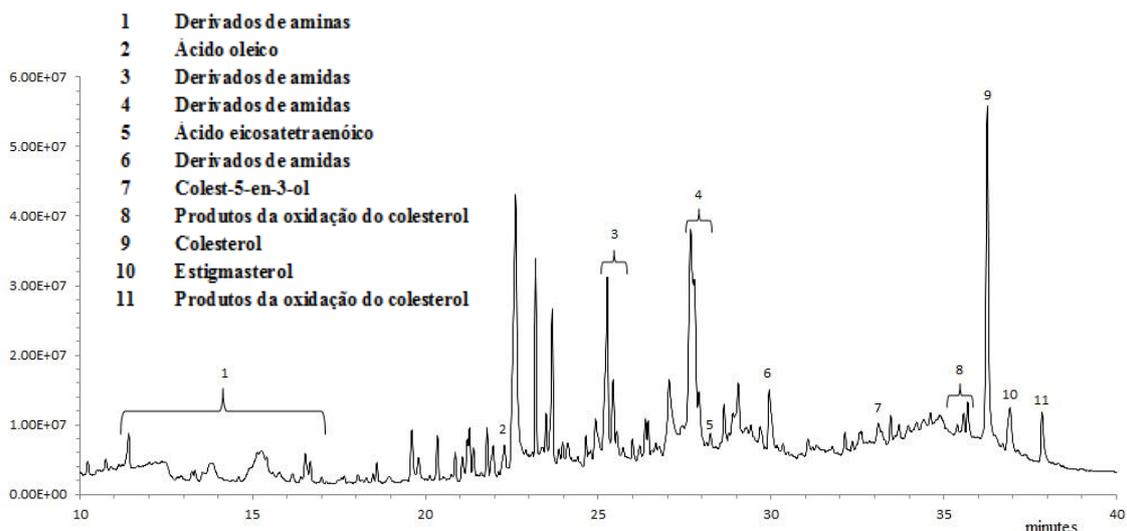


Figura 4.31 – Cromatograma de um extrato de berbigão, após extração com mistura de DCM:MeOH 50:50.

No entanto, apresenta-se como um trabalho em curso, onde a composição de outras espécies de moluscos galegos está sobre estudos, especialmente ostras, tendo em conta que esta seria um alimento exclusivo de famílias ricas, devido ao seu alto valor econômico.

4.9 – Preparado de peixe recuperado de um *doliola*

4.9.1 – Pequena contextualização histórica

A análise a fragmentos de contentores utilizados no transporte de preparados de peixe foi complementada com a análise a restos destes preparados (do tipo *Garum* ou *Alec*, ambos pastas ou líquidos fermentados preparados à base de peixes gordos, mas que por vezes também apresentavam crustáceos ou moluscos, como os gastrópodes) encontrados no interior de um *doliola* em Boca do Rio, Sagres, Algarve (Figura 4.32).



Figura 4.32 – Imagem do *doliola* de onde se recuperaram os restos de preparados de peixe.

4.9.2 – Resultados analíticos obtidos e conclusões

Neste *doliola* encontraram-se vestígios de dentes, espinhas e vértebras de peixe (Figuras 4.33a e 4.33b). Este foi submetido a testes analíticos e genéticos onde inicialmente foram extraídos, separados e analisados os compostos orgânicos inerentes (Figura 4.34) para comparação com os resultados obtidos nas análises anteriormente realizadas, e mais tarde, através da extração, deteção e amplificação de ADN (Figura 5.1), se proceder à compreensão de quais as espécies utilizadas na sua preparação.

a)



b)



Figura 4.33 – a) Parte do conteúdo dos preparados de peixe mostrando terra, areias e pedras à mistura, b) elementos de interesse retirados do conteúdo analisado. Entre o conjunto, foram separados por análise visual dentes, espinhas e vértebras de peixe.

Preparados de peixe: análise química

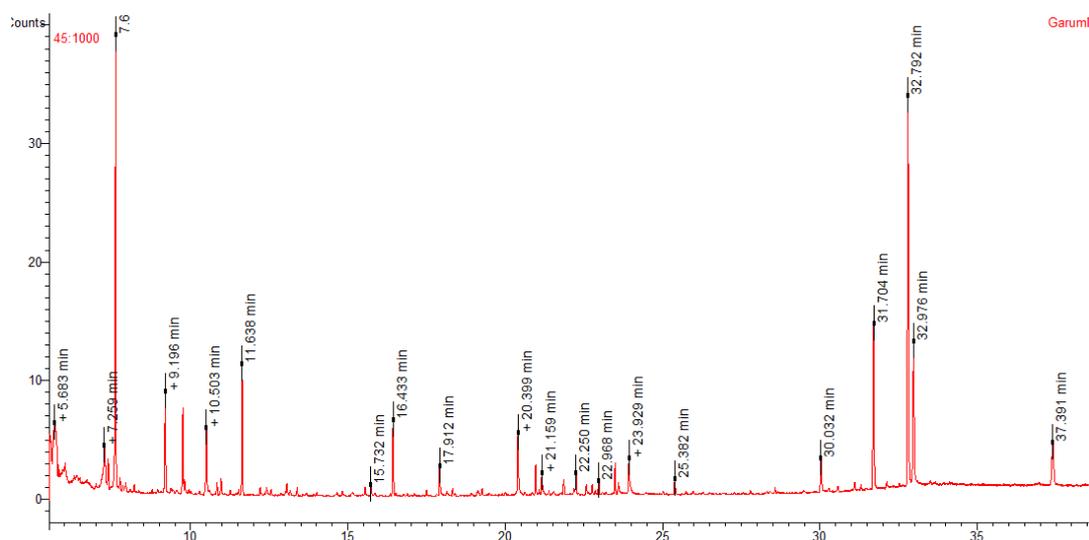


Figura 4.34 – Cromatograma obtido pela extração com MeOH e injeção da amostra de preparados de peixe.

Tabela 4.12 – Tabela de compostos extraídos da amostra de preparados de peixe

Ácidos orgânicos				
Lático	Sucínico	Adípico	Glutárico	Metoxicinâmico
Málico	Glucónico	3-hidroxiopropiônico	Série homóloga de ácidos alcanóicos lineares C7-C18	
Hidratos de carbono				
Frutose	Glucopirranose	Arabitol	Gulose	Inositol
Turanose	Sucrose	Glucitol	Xilofuranose	Altrose
Aminoácidos				
Alanina	Glicina			
Queima de biomassa vegetal				
Levoglicosano				
Óleos vegetais				
Isoeugenol	Oleanitrilo	Oleamida	Estigmasterol	
Restos de peixe ou moluscos/ostras				
Colesterol	5β-colestano-3-ona	Ácido palmitoleico C16:1 trans-9, ω7		Ácido miristoleico C14:1, cis-9, ω7
Ácido isoleico C18:1, trans-9, ω9	Ácido vacénico C18:1 trans-11, ω7	Ácido palmiteláidico C16:1 cis-9, ω7		Ácido oleico C18:1, ω9
Ácido fitânico	Ácido linoleico C18:2, ω6			

Na tabela 4.12 estão apresentados os resultados cromatográficos da análise à amostra de preparados de peixe encontrada no interior de um *doliola* em Boca do Rio. O primeiro conjunto de compostos são de alguma forma pouco específicos, pois, certos ácidos, como o málico, succínico ou láctico podem pertencer a um vasto conjunto de matrizes como vinho ou mel^{26,168}. O segundo conjunto corresponde ao grupo dos hidratos de carbono, que devido às suas elevadas intensidades, principalmente aquando extrações com metanol, sugere que os preparados de peixe terão sido adocicados artificialmente¹⁰⁰. Os aminoácidos detetados acabam por ser compatíveis com a existência de várias fontes possíveis, como mel ou fauna marinha¹⁴⁰, enquanto o levoglucosano, sugere que o preparado terá estado em algum momento, em contacto com algum tipo de fumo¹⁰⁸. Estão presentes alguns compostos característicos de óleos vegetais, que tal como no caso das ânforas anteriormente analisadas, sugerem que ao preparado tenha sido adicionado especiarias, plantas ou ervas aromáticas. O último grupo indica uma séria de traçadores moleculares característicos da existência de resíduos de peixe/fauna marinha em geral.

Preparados de peixe: análise genética

Avaliando toda a informação evidenciada pelos resultados analíticos, onde se demonstrou a existência de indícios químicos da presença de restos marinhos, tentou-se prosseguir o estudo no sentido de determinar quais as espécies marinhas envolvidas na elaboração deste preparado de peixe. Para isso, procedeu-se a uma série de ensaios genéticos com vista a isolar ADN antigo, obviamente degradado, amplificar os fragmentos identificados em sequências múltiplas e identificar as espécies em questão recorrendo a técnicas de sequenciação de última geração.

De acordo com a informação reunida, trata-se de uma metodologia inovadora e de um trabalho pioneiro em Portugal, pelo que se decidiu dedicar-lhe um novo capítulo desta tese de mestrado (Capítulo 5).

Capítulo 5

Análise de ADN antigo

5.1 - Resultados biológicos obtidos e conclusões

Na sequência das análises químicas efetuadas ao material recuperado do interior de um *doliola* encontrado em Boca do Rio, Algarve, decidiu-se avaliar da possibilidade de identificação das espécies marinhas envolvidas. Para isso foi desenvolvida uma metodologia pioneira no sentido de se isolar e amplificar ADN antigo do conteúdo de preparados marinhos, e assim identificar quais as espécies que estão na sua origem. Deste modo, neste capítulo serão descritos os resultados da aplicação de várias técnicas de manipulação de ADN, anteriormente descritas em maior pormenor na secção 2.5 do segundo capítulo, sob a designação “*Técnicas para a análise de ADN antigo*”.

Inicialmente testou-se a eficiência das combinações de primers selecionados na amplificação de ADN de tecidos biológicos recentes (ADN moderno): M₃ forward com M₃ reverse; M₄ forward com M₄ reverse; Micoi forward¹⁷¹ com Lobo reverse¹⁷² (M_f-L_r); Micoi forward¹⁷¹ com Geller reverse¹⁷³ (M_f-G_r); Micoi reverse¹⁷¹ com Lobo forward¹⁷² (M_r-L_f); Micoi reverse¹⁷¹ com Geller forward¹⁷³ (M_r-G_f). Para isto utilizaram-se tecidos biológicos de diferentes espécies marinhas, destacando-se o atum (*Auxis rochei* – 81), a sardinha (*Sarda sarda* – 169 e *Sardina pilchardus* - 170), a cavala (*Scomber scombrus*) e a raia (*Raja brachyura* - 318), além de uma espécie de gastrópode (*Calliostoma zizyphinum* – d29). Após o aperfeiçoamento das condições de amplificação de ADN, com a obtenção de bandas nítidas, obteve-se um conjunto de géis (Figura 5.1 e 5.2) que demonstraram a capacidade dos *primers* amplificarem o ADN moderno de peixe.

O recurso a uma enzima mais sensível e robusta que as “normais” polimerases usadas anteriormente permitiu antever um desempenho idêntico quando aplicado a ADN antigo, também de peixe. Por essa razão todos os trabalhos com ADN moderno utilizaram a enzima *DreamTaq Polymerase* da Thermo, uma enzima de custo relativamente reduzido e de uma sensibilidade e robustez comuns, enquanto nos trabalhos com ADN antigo se utilizou a enzima *Phusion Fidelity DNA Polymerase* da Thermo. Esta é uma enzima mais dispendiosa, mas também mais sensível e robusta, e por isso ideal para a manipulação de ácidos nucleicos muito fragmentados.

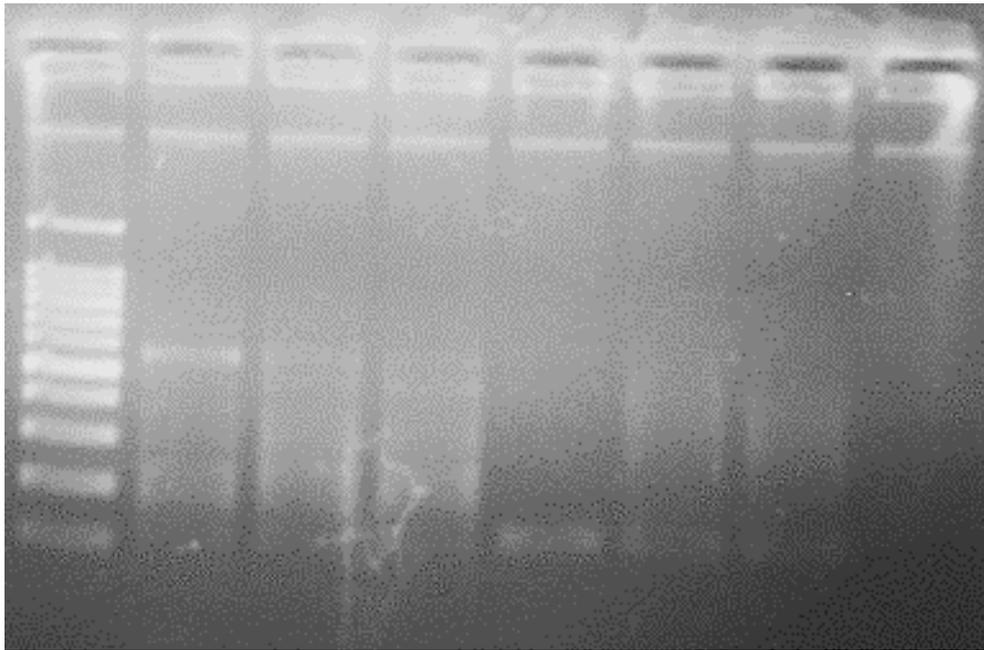


Figura 5.1 – Gel onde se apresentam os resultados dos primers M_3 e M_4 ao amplificarem ADN moderno. O primeiro poço apresenta bandas do Ladder (100 pb), de seguida na marca dos 100 pb apresentam-se 6 leves bandas, pertencendo as três primeiras ao primer M_3 e as seguintes ao M_4 , usadas na amplificação de ADN de *Auxis rochei*. A última está sem qualquer registo, pois é o negativo.

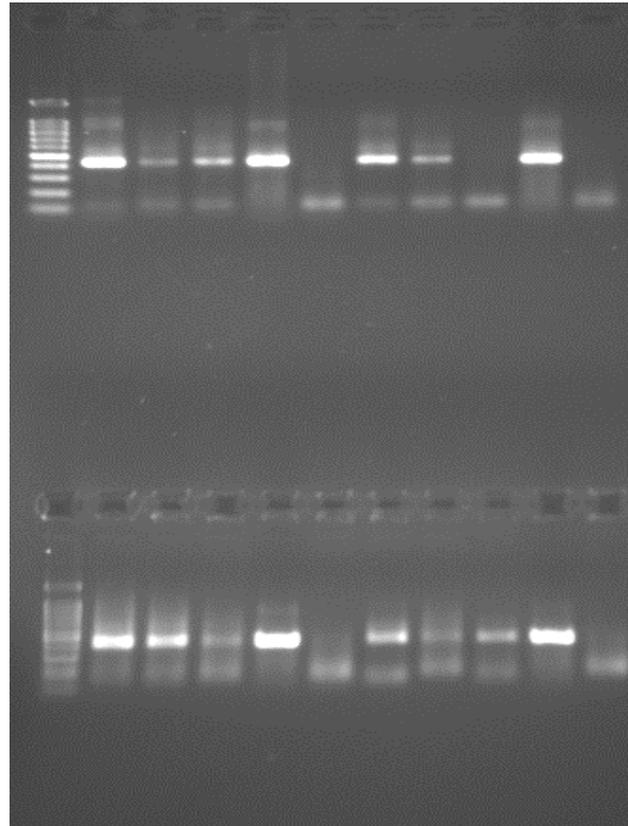


Figura 5.2 – Gel onde são apresentados fortes bandas para as combinações de primers testados: em cima - 1º Ladder 100 pb; 2º, 3º, 4º e 5º - M_r-L_r para 81, 169, 170 e d29; 6º - negativo, 7º, 8º 9 e 10º - M_r-G_r para 81, 169, 170 e d29; 11º - negativo. Em baixo – 1º Ladder 100 pb; 2º, 3º, 4º e 5º - M_r-L_r para 81, 169, 170 e d29; 6º - negativo, 7º, 8º 9 e 10º - M_r-G_r para 81, 169, 170 e d29; 11º - negativo.

Analisando as figuras 5.1 e 5.2 verificam-se diferenças claras no comportamento dos dois géis. No primeiro gel, os primers M₃ e M₄ apresentam uma maior dificuldade em detetar ADN nos tecidos de *Auxis rochei* por apenas amplificarem fragmentos com cerca de 100 pb (preparado para “recolher” os ácidos nucleicos mais fragmentados), exibindo por isso bandas muito ténues por volta dos 100 pb. Ainda assim, a captação e amplificação de ADN é reforçada pela inexistência de bandas no último poço (8º) onde apenas existem reagentes, sem qualquer material genético (negativo).

No segundo gel, são óbvios os resultados obtidos, onde apenas a combinação de primers M_r-G_r para o tecido 170 não funcionou. De resto, muito pelo facto destes primers amplificarem fragmentos de ADN de tamanho considerável (300pb), todas as bandas se apresentaram de forma limpa e nítida enquanto os negativos se mantiveram sem expressão.

Após a aplicação de vários métodos de extração de ADN da amostra de preparados de peixe recuperada do interior de uma *doliola* usando 3 diferentes métodos (kit de extração, kit de extração modificado e um método artesanal), verificou-se o sucesso na extração. Para isso, recorreu-se à nanodrop no sentido de se quantificar a concentração de ADN presente nos extratos. Dos 16 extratos analisados, foram os 11 provenientes dos métodos de extração com kit (modificado ou não) aqueles que se apresentaram mais viáveis, enquanto os 5 extratos provenientes do método artesanal^{77,82} apresentavam em média concentrações negativas de ácidos nucleicos (ng/ μ L) e os restantes apresentavam concentrações entre os 2 e os 22,5 ng/ μ L. Ainda assim, apesar dos 11 extratos obtidos a partir do método de kit (3 a partir do kit modificado e 8 a partir do kit) apresentarem maiores concentrações de ácidos nucleicos, as relações de $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ acabam por não ser muito favoráveis, pois apresentam em todos os casos valores abaixo dos 1,8 recomendáveis (rever capítulo 2 onde se descreve a técnicas de nanodrop). De qualquer forma, eliminou-se hipótese de realização de testes com as amostras provenientes do método artesanal, tendo-se continuado o trabalho ainda numa fase de testes preliminares com os restantes.

Desta forma, foram efetuadas várias experiências nas condições estabelecidas anteriormente de modo a se conseguir amplificar e detetar ADN antigo de preparados de peixe. Depois de diversas tentativas, tornou-se forçoso diminuir os gastos com reagente, pelo que apenas se utilizou as combinações de primers que parecia fornecer os melhores resultados, os M₃, M₄ e MicoiF-LoboR em 6 amostras extraídas com o kit de extração de ADN da Roche (G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆) (Kit não modificado).

Os resultados finais obtidos são indicados nas figuras 5.3, 5.4 e 5.5, tendo-se utilizado os primers M₃, M₄ e MicoiF-LoboR.

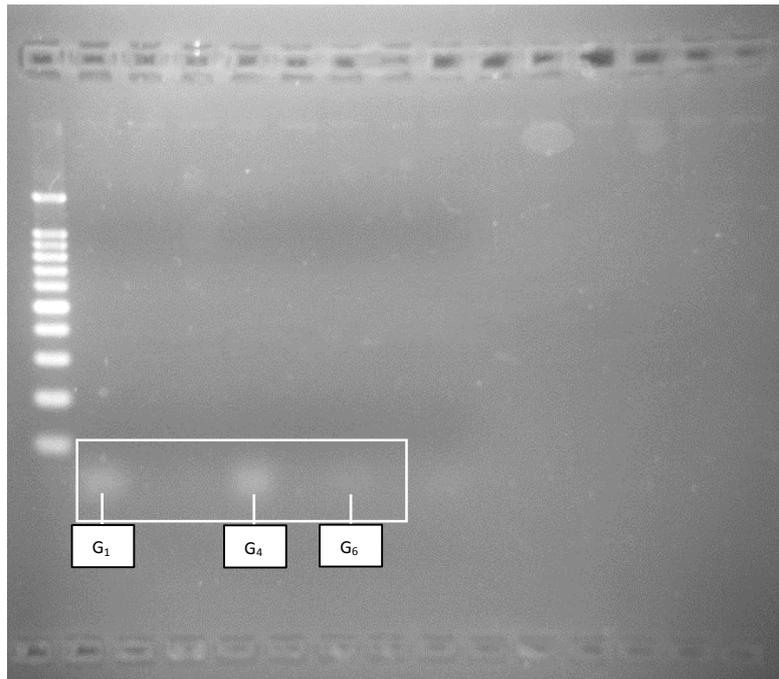


Figura 5.3 – Gel de agarose 1.5% onde são apresentadas resultados aquando utilização do primer M₃ para ADN antigo de preparados de peixe, tendo-se verificado bandas ténues nos poços 1, 4 e 6 correspondentes às amostras G₁, G₄ e G₆ por volta dos 100 pb.

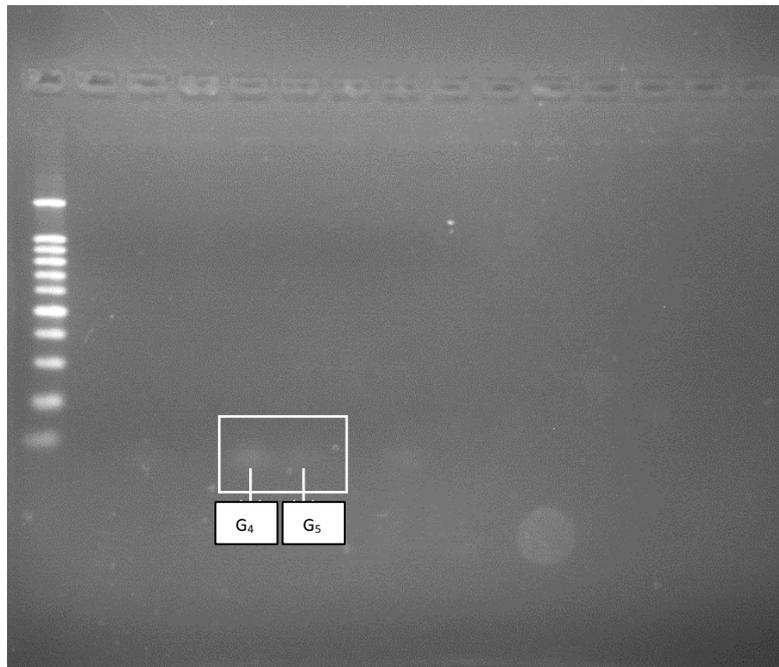


Figura 5.4 - Gel de agarose 1.5% onde são apresentadas resultados aquando utilização do primer M₄ para ADN antigo de preparados de peixe, tendo-se verificado bandas ténues nos poços 4 e 5 correspondentes às amostras G₄ e G₅ por volta dos 100 pb.

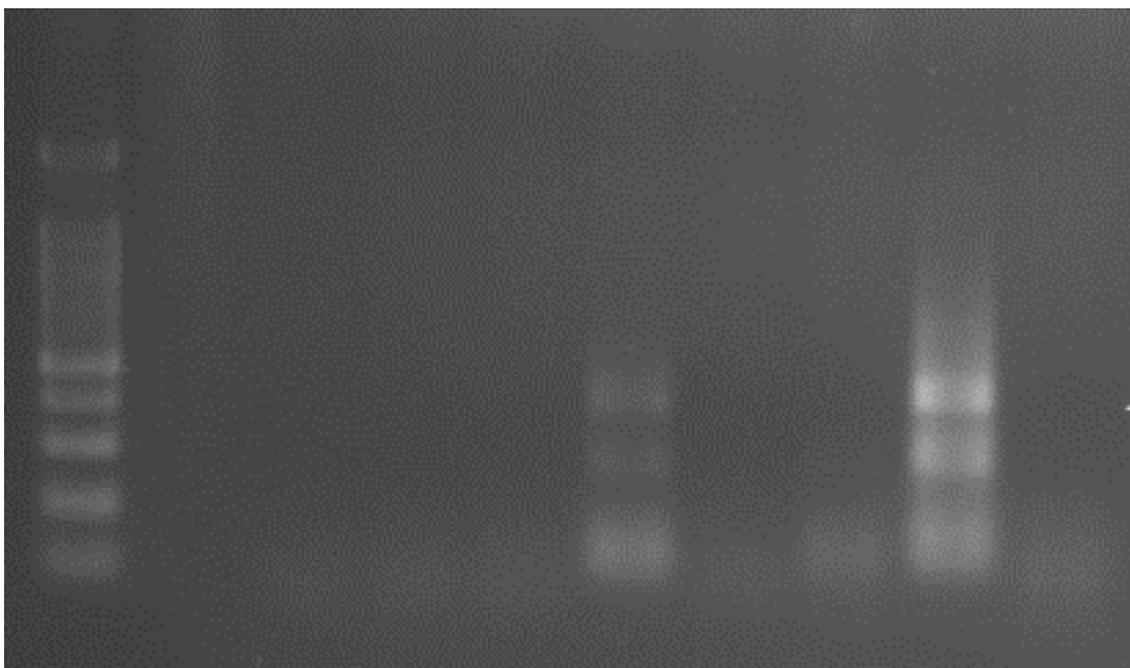


Figura 5.5 - Gel de agarose 1.5% onde são apresentadas resultados aquando utilização da combinação de primers MicoiF-LoboR para ADN antigo de preparados de peixe, tendo-se verificado uma banda de intensidade média no poço 5 correspondentes à amostra G₄ por volta dos 300 pb.

Nos dois primeiros casos, foi óbvio que apesar de todos os esforços, a deteção e expressão de ADN antigo ocorreu de uma forma muito ténue, sendo difícil a visualização de bandas que não sejam as referentes ao marcador molecular (ladder).

No gel pertencente às provas que envolvem o primer M₃, (Figura 5.3) conseguiu-se visualizar bandas de ADN antigo nos poços 1, 4 e 6 (amostras G₁, G₄ e G₆), enquanto naquele pertencente ao primer M₄ (Figura 5.4) apenas se detetaram bandas muito ténues nos poços 4 e 5 (amostras G₄, G₅). Em ambos os casos foram efetuados negativos que não apresentaram qualquer resultado, sendo por certo a não contaminação de reagentes e/ou ambiente. Ainda assim, em ambos os casos não foram efetuados controlos positivos *i.e.*, não foi testado ADN com prévio conhecimento de funcionamento.

Na figura 5.5 é demonstrado o gel de agarose com os resultados dispostos pela combinação de primers MicoiF-LoboR que evidenciam a amplificação de uma banda de ADN antigo no 5º poço, correspondente à amostra G₄. Esta série de ensaios foi sempre

realizado na presença de um positivo e negativo (positivo para comprovar que, caso nenhum ADN antigo seja amplificado, a causa não deverá ser atribuída às condições experimentais mas sim a outros fatores como a inexistência de ADN suficiente para ser visualizado num gel, por exemplo, enquanto que o negativo serve para a comprovação da inexistência de possíveis contaminações dos reagentes ou ambiente envolvente). Visto que o negativo não se expressou, e o positivo apresentou uma banda forte (poço 8), tudo deverá ter corrido de forma exemplar.

Na hipótese de certas bandas poderem não apresentar ADN suficiente para visualização nos géis, surgiu a possibilidade de submeter alguns extratos de PCR a novos ciclos de PCR, tornando o procedimento num PCR de PCR. Esta nova metodologia foi aplicada unicamente aos resultados obtidos pela combinação de primers MicoiF-LoboR, estando os resultados expressos na figura 5.6.

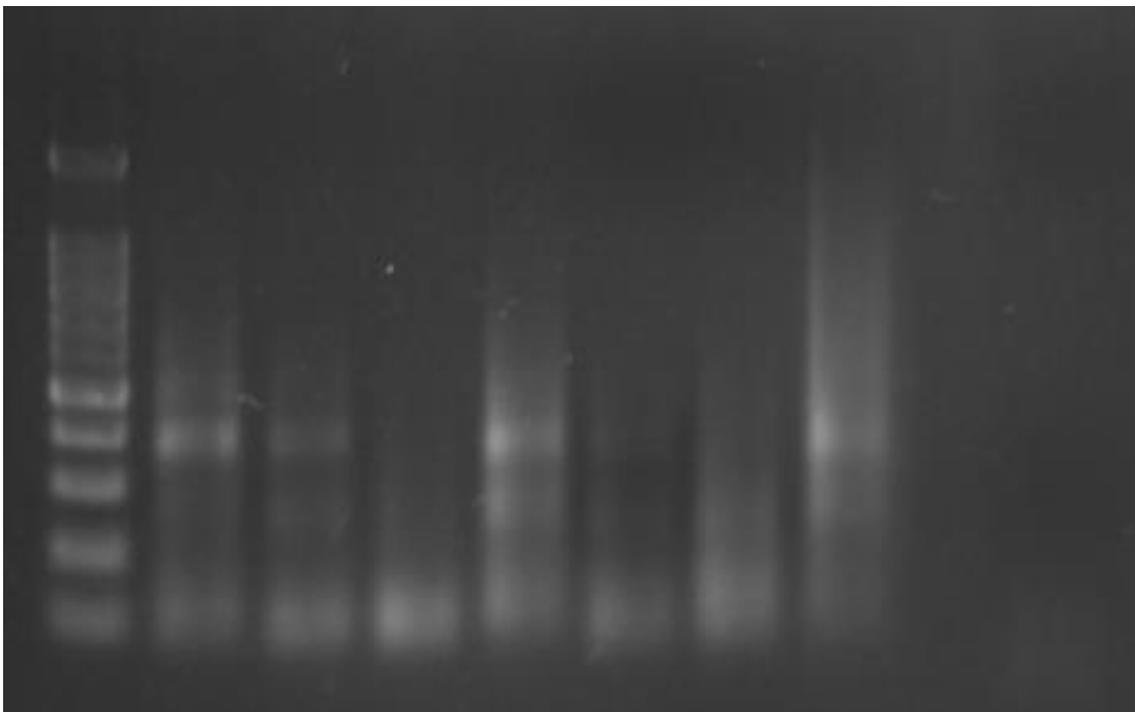


Figura 5.6 - Gel de agarose 1.5% realizado a partir de um PCR de PCR sobre os extratos que originaram o gel da figura 4.37, onde são apresentados resultados aquando utilização da combinação de primers MicoiF-LoboR para ADN antigo de preparados de peixe, tendo-se verificado bandas fortes no poço 1, 2, 4 e 5, referentes às amostras (G₁, G₂, G₄ e G₅) por volta dos 300 pb.

Tal como se suspeitava, por este ADN em concreto ser muito fragmentado (tendo em conta que apresenta milhares de anos), as suas concentrações mesmo após vários ciclos de um primeiro PCR não são, regra geral, suficientes para a sua visualização num gel de agarose 1.5%. No entanto, após um segundo PCR aplicado aos produtos obtidos num primeiro, os resultados apresentam-se diferentes. A exponencial amplificação de moléculas de ADN geradas no segundo ciclo é de tal forma enorme, que a maior parte das bandas, outrora invisíveis num gel, apresentam-se agora fortes e nítidas. Desta forma, foi possível a amplificação de ADN antigo nos poços 1, 2, 4 e 5, referentes às amostras G₁, G₂, G₄ e G₅, sendo também visível no poço 7 a banda referente ao positivo. O negativo no poço 9 não apresenta qualquer sinal de amplificação.

Os produtos amplificados com sucesso foram enviados para a *BioCant*, de forma a serem sequenciados por NGS. As leituras efetuadas na *BioCant* foram devidamente filtradas resultando num número muito baixo de sequências elegíveis, devido à idade avançada do ADN apresentado. Ainda assim, as corridas efetuadas resultaram na obtenção de 323 sequências de ADN elegíveis. Os testes de similaridade em bibliotecas de referência (BOLD e Genebank) resultaram na correspondência de 236 dessas leituras, com elevada similaridade. Desse grupo, cerca de 96 leituras permitiram a identificação de sete espécies de peixe com percentagens de similaridade entre os 99 e os 100%, todas elas pertencentes a espécies conhecidas da costa Atlântica portuguesa, sendo seis tipos de peixes ósseos e um tubarão de grande porte (Tabela 5.1).

Com o objetivo de validar estes resultados ainda preliminares, estão a ser preparadas novas análises de replicação usando outras amostras de preparados de peixe e novos reagentes e soluções.

Tabela 5.1 – Lista de espécies de animais marinhos identificados após sequenciação NGS.

Nome comum	Espécie
Carapau	<i>Megalaspis cordyla</i>
Peixe voador	<i>Cheilopogon unicolor</i>
Sargo-alcorraz	<i>Diplodus annularis</i>
Caboz negro	<i>Gobius niger</i>
Peixe ruivo	<i>Lepidotrigla dieuzeidei</i>
Bodião	<i>Symphodus bailloni</i>
Tubarão sardo	<i>Isurus oxyrinchus</i>

Conclusão

Estabeleceram-se metodologias apropriadas para a análise de artefactos cerâmicos, particularmente técnicas de amostragem, extração e análise cromatográfica, com a identificação dos traçadores moleculares mais relevantes. Seguindo estes procedimentos determinou-se a funcionalidade de trinta e dois contentores cerâmicos, nomeadamente, três vasos da idade do bronze, cinco ânforas vinárias, oito potes meleiros, duas colmeias cerâmicas, uma candela romana, três lucernas egípcias e dez ânforas de transporte/armazenamento de preparados piscícolas.

Os procedimentos anteriormente estabelecidos serviram de base para a análise de pigmentos aplicados em monumentos megalíticos, tendo-se complementado a análise cromatográfica com a utilização de outras técnicas como o FTIR e o XRD, ambos de utilização mais apropriada para a análise estrutural desses pigmentos. Estas metodologias foram aplicadas com sucesso, tendo-se concluído que em ambos os monumentos, foi aplicado uma mistura que envolvia óleos vegetais e um composto mineralógico que dava a cor apresentada por cada um, sendo que na mamoa da Eireira era empregue hematite ou goetite de coloração avermelhada, e na mamoa de Lamas, caulinite de cor branca. Foi também detetada a presença de têmpera de ovo na mamoa da Eireira, provavelmente para consolidar a mistura entre o mineral e os óleos vegetais.

A disponibilidade de utilizar para investigação restos de preparados de peixe datados do século IV permitiu a aplicação simultânea de técnicas de caracterização química, assim como efetuar análises genéticas aos mesmos, no sentido de se identificarem as espécies marinhas utilizadas na sua preparação. Para isso foram desenvolvidas metodologias pioneiras que permitiram identificar seis espécies de peixes ósseos e um tubarão de grande porte, todas espécies comuns na costa marítima portuguesa. Embora tratando-se de resultados ainda preliminares e a necessitar de confirmação futura, apresentam-se como verdadeiramente inovadores dada a escassez de estudos publicados nesta área.

Este trabalho, tal como o seu título procurou indicar, demonstra a necessidade da realização de trabalhos interdisciplinares, que associem à arqueologia a contribuição de diferentes ciências como a química, a biologia, paleontologia, ou a geologia, entre muitas outras.

Bibliografia

- 1 - Atmore, A., "História do Homem nos Últimos Dois Milhões de Anos", **1975**, Reader`s Digest, Lisboa, 15-27.
- 2 - Rolland, J., "Historama – A grande aventura do homem (Vol 1) da pré-história ao primeiro império universal", **1972**, CODEX LTDA, 9-14.
- 3 - Pt.wikipedia.org/wiki/Pr%C3%A9-hist%C3%B3ria_da_pen%C3%ADnsula_Ib%C3%A9rica, acessido a 13 de janeiro de 2015.
- 4 - http://www.lacittadelluomo.it/pagina_sez02_06a.htm, acessido a 13 de janeiro de 2015.
- 5 - <http://basicolbv.wordpress.com/neolitico/>, acessido a 13 de janeiro de 2015.
- 6 - Lafforge, G., "História Universal – A alta antiguidade, das origens a 550 a.C. nº1", **1979**, Publicação Dom Quixote, 43-59.
- 7 - Barnard, H., Dooley, A. N., Areshian, G., Gasparian, B., Faull, K. F., "Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands", **2010**, Journal of Archaeological Science, *38*, 977-984.
- 8 - Petit, P., "O Mundo antigo (Vol 1)", **1976**, edições Ática, 9-16.
- 9 - <https://plus.google.com/+IndianagricultureInformation/posts>, visto a 13 de janeiro de 2015.
- 10 - Conti, F., "Os Grandes Impérios - os antigos egípcios", **1982**, círculo de leitores Ltda, 18-86.
- 11 - http://en.wikipedia.org/wiki/Ancient_maritime_history, acessido a 13 de janeiro de 2015.
- 12 - <http://www.ngv.vic.gov.au/col/work/1359>, acessido a 13 de janeiro de 2015;
- 13 - Beaudry, C., Long, J., Miller, H., Neiman, F., Stone, G., "A vessel typology for early Chesapeake ceramics: the Potomac typological system", **1983**, Historical Archaeology, *17*, 18-43.
- 14- Effenterre, H., "História Universal – A idade Grega, 550 a.C. a 270 a.C., nº2", **1979**, Publicação Dom Quixote, 11-74.
- 15 - Dorrego, F., Carrera, F., Luxán, M. P., "Investigations on Roman amphorae sealing systems", **2004**, Materials and Structures, *37(5)*, 369-374.
- 16 - Morais, R., Monfort, C. C., "Geografia del consum de les Haltern", **2004**, Monografies del Casc 5, *8*, 93-112.
- 17 - Delgado, M., Morais, R., "Varia (acessórios para olarias, peças de jogo, produções subsidiárias e outras atividades)", **2009**, in CITCEM, "Guia das cerâmicas de produção local de Bracara Augusta", Braga, *9789899351005*, 107-118.
- 18 - Morais, R., "Ânforas", **2012**, in Alarcão, J., Barroca, M., "Dicionário de Arqueologia Portuguesa", (eds, Figueirinhas), Porto, *978-972-661-219-3*, 29-30.
- 19 - <http://www.owuscholarship.org/scholar/matt-carter/journal/jun-2009>, acessido a 13 de janeiro de 2015.

Bibliografia

- 20 - Morais, R., "Bracara Augusta: um pequeno "testaccio" de ânforas Haltern 70. Considerações e problemáticas", **2004**, in BAR internacional series "" ex-officina hispânica, 1-84171-372-4, 545-566.
- 21 - <http://archaeological.org/fieldwork/afob/2495>, acessado a 14 de janeiro de 2015.
- 22 - Monfort, C. C. e Morais, R., "The Western Roman Atlantic Façade: A Study of the Economy and Trade in the Mar Exterior from the Republic of the Principate", **2010**, Archaeopress, 978-1-40730806-0, 2162-2164.
- 23 - Oliveira, C., Araújo, A., Kuzniarska-Biernacka, I., Morais, R., Parpot, P., Neves, I. C., Fonseca, A. M., "Análise química cromatográfica a fragmentos cerâmicos de potes meleiros e colmeias", **2014**, in "As produções cerâmicas de imitação na Hispania" – Monografias Ex officina Hispana II, Tomo I, Braga, 978-989-8648-34-1, 599-610.
- 24 - Oliveira, C., Kuzniarska-Biernacka, I., Neves, I. C., Fonseca, A. M., Parpot, P., **2013**, "Chemical Analysis of Organic Residues in Amphorae from the Baetica Shipwreck of Esposende", in Morais, R., Granja, H., Cerdán, M., O Irado Mar Atlântico – O naufrágio Bético Augustano de Esposende (Norte de Portugal), Braga, 978-989-97443-1-8, 247-261.
- 25 - Heron, C., Andersen, S., Fischer, A., Glykou, A., Hartz, S., Saul, H., Steele, V., Craig, O., "Illuminating the Late Mesolithic: residue of "blubber" lamps from Northern Europe", **2013**, Antiquity Publications Ltd, *Antiquity* 87, 178-188.
- 26 - Jerkovic, I., Marijanović, Z., Gugić, M., Roje, M., "Chemical Profile of the Organic Residue from Ancient Amphora Found in the Adriatic Sea Determined by direct GC and GC-MS Analysis", **2011**, *Molecules*, 16, 7936-7948.
- 27 - Riché, P., "História Universal – Grades invasões e Impérios, séculos V a X., nº5", **1979**, Publicação Dom Quixote, 63-99.
- 28 - Guillemain, B., "História Universal – O despertar da Europa, do ano 1000 a 1250., nº6" **1979**, Publicação Dom Quixote, 237-263.
- 29 - Penã, J. T., "Roman Pottery in the Archaeological Record", **2007**, in Cambridge University Press, London, 978-0-511-28502-8, 32-61.
- 30 - Neves, I. C., Fonseca, A. M., Oliveira, C., Parpot, P., Kuźniarska-Biernacka, I., Morais, R., "Caracterização de fragmentos cerâmicos oriundos do naufrágio bético Augustano de Esposende por DRX e MEV-EDS", **2013**, in Morais, R., Granja, H., Cerdán, M., O Irado Mar Atlântico – O naufrágio Bético Augustano de Esposende (Norte de Portugal), Braga, 978-989-97443-1-8, 263-281.
- 31 - Charters, S., Evershed, R. P., Goad, L. J., Leyden, A., Blinkhorn, P. W., Denham, V., "Quantification and distribution of lipid in archaeological ceramics: implications for sampling potsherds for organic residue analysis and the classifications of vessel use", **1993**, *Archaeometry* 35(2), 211-223.
- 32 - Stern, B., Heron, C., Serpico, M., Bourriau, J., "A comparison of methods for establishing fatty acid concentration gradients across potsherds: a case study using late bronze age canaanite amphorae", **2000**, *Archaeometry* 42(2), 399-414.

- 33 - Araújo, A., Dissertação final de licenciatura em Bioquímica, Universidade do Minho, “Análise química de artefactos arqueológicos”, **2013**.
- 34 - Penã, J. T., “Roman Pottery in the Archaeological Record”, **2007**, in Cambridge University Press, London, 978-0-511-28502-8, 83-109.
- 35 - Goransson, K., “The transport amphorae from Euesperides: The maritime trade of a Cyrenaican city 400-250 BC”, **2007**, Acta Archaeologica Lundensia, Series in 4o No. 25 (9), Stockholm, Sweden, 978-91-22-02164-3.
- 36 - Adkins, L., Adkins, R. A., “Handbook to life in Ancient Rome”, **1998**, in Oxford University, 978-0195123326, 353 – 360.
- 37 - Morais, R., Fabião, C., “Novas produções de fabrico lusitano: problemáticas e importância económica”, **2007**, in Centro de Arqueologia da Universidade de Lisboa UNIARQ, Lisboa, Portugal, 978-84-95815-14-9, 127 – 133.
- 38 - <http://archaeoethnologica.blogspot.pt/2013/10/anforas-lusitanas-congresso.html>, acedido a 14 de janeiro de 2015.
- 39 - Morais, R., Oliveira, C., Araújo, A., “The early productions of Lusitanian origin”, **2013**, in Congresso Internacional Ânforas Lusitanas – Produção e Difusão, Troia, Portugal, BAR (no prelo).
- 40 - Fernández, E. G., Gascón, M. C., “Lucus Augusti: cidade y contexto arqueológico”, **2011**, in Ânforas romanas de Lugo: Comercio romano en el Finis Terrae, por Lugo: Concello de Lugo, 978-84-92895-09-0, 20-33.
- 41 - Morais, R., Carreras, C., “Las ánforas de Lucus Augusti” **2011**, in Ânforas romanas de Lugo: Comercio romano en el Finis Terrae, por Lugo: Concello de Lugo, Lugo, Espanha, 978-84-92895-09-0, 34-80.
- 42 - http://archaeoethnologica.blogspot.pt/2013_03_01_archive.html, acedido a 14 de janeiro de 2015.
- 43 - Morais, R., “Durius e Leça: Dois percursos de um mesmo itinerário – Problemáticas em torno das ânforas Haltern 70”, **2013**, Portugalia, Nova Série, Porto, Portugal, 34, 101-136.
- 44 - <http://amphorae.icac.cat/tipol/view/44>, acedido a 14 de janeiro de 2015.
- 45 - Sabrosa, A., Bugalhão, J., “As ânforas béticas do núcleo arqueológico da rua dos correeiros, Lisboa”, **2004**, in Atas do congresso Internacional Figlinae Baeticae: talheres alfareros e produções cerâmicas na bética romana (ss. II a.C.-VII d.C.). Oxford: Archaeopress, Cádiz, Espanha, *International Serie*, 1266, 571-585.
- 46 - Arruda, A. M., Viegas, C., Bargão, P., “As ânforas da Bética costeira na Alcáçova de Santarém”, **2005**, Revista Portuguesa de Arqueologia, 8 (1), 279-297.
- 47 - <http://www.abyssoflu.com/amphorae003betica.htm>, acedido a 14 de janeiro de 2015.
- 48 - <http://www.gazdtort.com/temak/romai-gazdasagtortenet/forrasok/tomeges-targyi-forrasok/amphorak/>, acedido a 15 de janeiro de 2015.

Bibliografia

- 49 - Tchernia, A., "Le vin de l'italie romaine. Essai d'histoire économique d'après les amphores", **1988**, *Reveu belge de philologie et d'histoire*, 66 (66-1), 166-167.
- 50 - Paroli, L., "Ostia alla fine del mondo antico: nuovi dati dallo scavo di magazzino doliare", **1996**, in Gallina Zevi, A. And Claridge, A., *Roman Ostia revisited: archaeological and historical papers in memory of Russel Meigs*, London: British school at Rome, Italy, 249-264.
- 51 - Slane, K., "Amphoras – used and reused", **2004**, in Lund, J., and Eiring, J., *acts of an international colloquium at the Danish institute of Athens, Greece*, 361-369.
- 52 - Bortolin, R., "Archeologia del miele", **2008**, in *SAP Societ  Archeologica*, 978-88-87115-59-8, (45), 101-124.
- 53 - http://cantinho-do-pequenote.blogspot.pt/2008_03_01_archive.html, acedido a 15 de janeiro de 2015.
- 54 - Morais, R., "Potes meleiros e colmeias em cerâmica: uma tradi o milenar", **2006**, *Sanguntum*, 38, 141-161.
- 55 - Rosado, B., Parre o, C, M., "Testimonios de apicultura en época iberica", **1995**, *Verdolay: Revista del Museo Arqueológico de M rcia*, 7, 177-185.
- 56 - www.conimbriga.pt/portugues/fotos_museu_sala2.html?foto=museu_sala1_39_1.jpg , acedido a 15 de janeiro de 2015.
- 57 - Kimpe, K., Jacobs, P, A., Waelkens, M., "Analysis of oil used in late Roman oil lamps with different mass spectrometry techniques revealed the presence of predominantly olive oil together with traces of animal fat", **2004**, *Journal of Chromatography A*, 937 (1-2), 87-9.
- 58 - <http://www.conimbriga.pt/portugues/fotos>, acedido a 15 de janeiro de 2015.
- 59 - Amiran, R., "Ancient Pottery of the holy land", **1969**, *Pely Printing Works*, 8135-0634-4, 33-54.
- 60 - Silva, A., Ribeiro, M., "Cer mica medieval das escava es no castelo de Arouca, ensaio de análise morfotipol gica", **2007**, *Nova Série, Portugalia*, 28, 69-88.
- 61 - Estreicher, S, K., "Wine the past 7400 years", **2004**, *Texas Tech University online, Texas, EUA*.
- 62 - <https://www.flickr.com/photos/18909153@N08/4650102652/>, acedido a 15 de janeiro de 2015.
- 63 - http://www.conimbriga.pt/portugues/fotos_museu_sala2.html?foto=museu_sala1_37.jpg, acedido a 15 de janeiro de 2015.
- 64 - Shott, M., "Mortal pots: on use life and vessels size in the formation of ceramic assemblages", **1996**, *American Antiquity*, 61, 463-482.
- 65 - <http://majosilveiro.blogspot.pt/2011/08/mamoa-do-batateiro-serra-da-peneda-gave.html>, acedido a 16 de janeiro de 2015.
- 66 - <http://majosilveiro.blogspot.pt/2011/08/mamoa-do-batateiro-serra-da-peneda-gave.html>, acedido a 16 de janeiro de 2015.

- 67 - Watson, A., Keating, D., "Architecture and Sound: an acoustic analysis of megalithic monuments in prehistoric Britain", **1999**, *Antiquity*, 73 (280), 325-336.
- 68 - Ramirez, P., Berhmann, R., Laporte, L., Gouezin, P., Bermejo, R., Gismero, A., Vallejo, J., Cela, M., "Paiting in Atlantic Megalithic Art: Barnenez", **2012**, *Trabajos de Prehistoria*, 69 (1), 123-132.
- 69- Brown, T., Brown, K., "Biomolecular Archaeology, an Introduction", **2011**, Wiley-Blackwell, UK, 978-1-4051-7960-7, 136-149;
- 70 - <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAE3LsAD/bromatologia-lipideos>, acessado em 27 de Dezembro de **2013**.
- 71 - Luz, L. P., Tese de Mestrado em Química, Universidade Federal Rio Grande do Sul, "Estudo do Ultra-Som como Técnica de Extração de Carvões e Caracterização dos Hidrocarbonetos Poli aromáticos", Brasil, **1998**.
- 72 - Veggi, P. C., Martinez, J., Meireles, A. A., "Fundamentals of Microwaves Extraction", **2013**, Food Engineering Series – Springer Science, Brasil, 978-1-4614-4830-3, 15-52.
- 73 - Almeida, F., Tese de Mestrado em Engenharia Biológica, Universidade superior técnica de Lisboa, "Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril", Lisboa, **2009**.
- 74- Torres, S., Tese de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, "Caracterização Comparativa do Esmalte de Dentes Decíduos Permanentes por Espectroscopia de Raman", Brasil, **2008**.
- 75 - Pier, P., *Apontamentos das aulas de Técnicas de Separação e Análise*, Módulo 2, Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química, Universidade do Minho, Braga, **2013**.
- 76 - Neves, I. C., *Apontamentos das aulas de Análise de Materiais e Superfícies*, Módulo 2, Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química, Universidade do Minho, Braga, **2013**.
- 77 - Evershed, R.P., "*Biomolecular archaeology and lipids*", **1993**, *World Archaeology*, 25(1), 74-93.
- 78 - Vitelli, K. D., "Were Pots first made of food? Doubts from Franchthi", **1989**, *World Archaeology*, 21, 17-29.
- 79- McGovern, P. E., "Uncorking the Past: The Quest for Wine, Beer, and other Alcoholic Beverages", **2009**, University of California Press, 9780520267985.
- 80 - McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, J. V., "Neolithic Resinated Wine", **1996**, *Nature*, 381, 480-481.
- 81 - McGovern, P. E., "Wine of Egypt's golden age: an archaeochemical perspective", **1997**, *Journal of Egyptian Archaeology*, 83, 69-108.
- 82 - Cheynier, V., Duenãs-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., "Structures and Properties of wine pigments and tannins", **2006**, *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 298-305.

Bibliografía

- 83 - Guasch-Jané, M. R., Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R. M., "Liquid Chromatography with mass spectrometry in tandem mode applied for the identification of wine markers in residues from ancient Egyptian vessels", **2004**, *Analytical Chemistry*, *76*, 1672-1677.
- 84 - Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., "Lehninger Principles of Biochemistry", **2004**, William Freeman and Company, 9789716743392.
- 85 - Vika, E., Theodoropoulou, T., "Re-Investigation fish consumption in Greek antiquity: results from δ^{13} and δ^{15} N analysis from fish bone collagen", **2012**, *Journal of Archaeological Science*, *39*, 1618-1627.
- 86 - Carannante, A., Giardino, C., Savarese, U., "In search of garum. The "Colatura d'alici" from the amalfitan coast (Campania, Italy): an heir of the ancient Mediterranean fish sauces", **2011**, in Proceedings of the 4th Italian Congress of Ethnoarchaeology, Oxford, 978-1-4073-0797-8, 69-79.
- 87 - Cassola, D. B., Romero, A. M. S., "Infundibula gaditana Acerca de los vasos troncocónicos perforados para filtrar garum y otros usos industriales en la Bahía de Cádiz", **2006**, in *Romula*, *5*, Cadiz, 1695-4076, 167-218.
- 88 - Olsson, M., Isaksson, S., "Molecular and isotopic traces of cooking and consumption of fish at an Early Medieval manor site in eastern middle Sweden", **2008**, *Journal of Archaeological Science*, *35*, 773-780.
- 89 - Yin, H., Brooks, J. D., Gao, L., Porter, N. A., Morrow, J. D., "Identification of Novel Autoxidation Products of the ω -3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid *in Vitro* and *in Vivo*", **2007**, *The Journal of Biological Chemistry*, *282(41)*, 29890-29901.
- 90 - Ozogul, Y., Ozogul, F., Çiçek, E., Polat, A., Kuley, E., "Fat content and fatty acid compositions of 34 marine water fish species from the Mediterranean Sea", **2009**, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *60(6)*, 464-475.
- 91 - Goffer, Z., "Archaeological Chemistry - Lipids: Oils, Fats and Waxes Soap", **2005**, John Wiley & Sons, Inc, 9780471915256, 311-319.
- 92 - Schwender, J., Zeidler, J., Groner, R., Muller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F. W., Lichtenthaler, H. K., "Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol in higher plants and algae", **1997**, *FEBS Letters*, *414*, 129-134.
- 93 - Hansel, F. A., Copley, M. S., Madureira, A. S., Evershed, R. P., "Thermally produced ω -(*o*-alkylphenyl)alkanoic acids provide evidence for the processing of marine products in archaeological pottery vessels", **2004**, *Tetrahedron Letters*, *45*, 2999-3002.
- 94 - Hansel, F. A., Evershed, R. P., "Formation of dihydroxy acids from Z-monounsaturated alkenoic acids and their use as biomarkers for the processing of marine commodities in archaeological pottery vessels", **2009**, *Tetrahedron Letters*, *50*, 5562-5564.
- 95 - Ruoff, K., Thesis of Doctor in Sciences, University of Helsinki, "Authentication of the Botanical Origin of Honey", **2006**.

- 96 - Senila, L., Gog, A., Senila, M., Roman, C., Silaghi-Dumitrescu, L., "Development of a GC-MS Method for 5-hydroxymethylfurfural Determination in Wood after Steam-explosion Pretreatment", **2012**, *Chimie (Bucharest)*, *63(6)*, 557-561.
- 97 - Kujawski, M. W., Namiesnik, J., "Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues", **2008**, *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, *27(9)*, 785-793.
- 98 - Féas, X., Pires, A. I., Estevinho, M. L., "Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data", **2010**, *Food and Chemical Toxicology*, *48(12)*, 3462-3470.
- 99 - Pereira, A. P., Tese de doutoramento, Escola Superior de Agrária, Instituto politécnico de Bragança, "Caracterização de mel com vista à produção de hidromel", **2008**
- 100 - Mayyas, A. S., Al-Qudah, M. A., Douglas, K. A., Al-Ajlouny, F. K., "Beeswax Preserved in Archaeological Ceramics: Function and Use", **2012**, accepted for publication in *Annals of Faculty of Arts, Ain Shams University*, *40(2)*, 1-5.
- 101 - Namdar, D., Neumann, R., Goren, Y., Weiner, S., "The Contents of Unusual Cone-Shaped Vessels (Cornets) from the Chalcolithic of the Southern Levant", **2009**, *Journal of Archaeological Science*, *36*, 629-636.
- 102 - Buckley, S. A., Evershed, R. P., "Organic Chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies", **2001**, *Nature*, *413*, 837-841.
- 103 - Regert, M., Colinart, S., Degrand, L., Decavallas, O., "Chemical Alteration and Use of Beeswax Through Time: Accelerated Ageing Tests and Analysis of Archaeological Samples from Various Environmental Contexts", *Archaeometry*, **2001**, *43*, 549-569.
- 104 - Baeten, J., Romanus, K., Degryse, P., De Clercq, W., Poelman, H., Verbeke, K., Luybaerts, A., Walton, M., Jacobs, P., De Vos, D., Waelkens, M., "Application of a Multi-Analytical Toolset to a 16th Century Ointment: Identification as Lead Plaster Mixed with Beeswax", **2010**, *Microchemical Journal*, *95*, 227-234.
- 105 - Garnier, N., Cren-Olivé, C., Rolando, C., Regert, M., "Characterization of Archaeological Beeswax by Electron Ionization and Elettrospray Ionization Mass Spectrometry", **2002**, *Analytical Chemistry*, *74*, 4868-4877.
- 106 - Regert, M., "Chemical alteration and use of beeswax through time: accelerated ageing tests and analysis of archaeological samples from various environmental contexts", **2001**, *Archaeometry*, *43(4)*, 549-569.
- 107 - Patel, S., Nelson, D. R., Gibbs, A. G., "Chemical and Physical Analyses of Wax Ester Properties", **2001**, *Journal of Insect Science*, *1.4*, Available Online: insectscience.org/1.4.7.
- 108 - Simoneit, B. R. T., Schauer, J.J., Nolte, C. G., Oros, D.R., Elias, V. O., Fraser, M. P., Rogge, W. F., Cass, G. R., "Levoglucosan, a tracer for Cellulose in biomass burning and atmospheric particles", **1999**, *Atmospheric Environment*, *33*, 173-182.
- 109 - Locker, H. B., Tese de doutoramento, Dartmouth College, Hannover, "The use of Levoglucosan to assess the environmental impact of residential wood burning on air quality", **1988**.

Bibliografia

- 110 - Marchand-Geneste, N., Carpy, A., "Theoretical study of the thermal degradation pathways of abietane skeleton diterpenoids: Aromatization to retene", **2003**, *Molecular Structure Theochemi*, 635, 55-82.
- 111 - Waterman, E., Lockwood, B., "Active Components and Clinical Applications of Olive Oil", **2007**, *Alternative Medicine Review*, 12, 331-342.
- 112 - Harwood, J. L., Yaqoob, P., "Nutritional and health aspects of olive oil", **2002**, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 685-697.
- 113 - Owen, R. W., Giacosa, A., Hull W. E., "Olive oil consumption and health: possible role of antioxidants", **2000**, *Lancet Oncology*, 1, 107-112.
- 114 - Newmark, H. L., "Squalene, Olive oil and cancer risk: a review and hypothesis", **1997**, *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 6, 1101-1103.
- 115 - Romero, C., Medina, E., Vargas, J., "In Vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*", **2007**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 680-686.
- 116 - Castel, C., Fernandez, X., Filippi, J., Brun, J., "Perfumes in Mediterranean antiquity", **2009**, *Flavor and Fragrance Journal*, 24, 326-334.
- 117 - Garnier, N., Silvino, T., Tokarski, C., Rolando, C., "Des Balsamiques Gallo-Romains Livrent Leur Contenu", **2008**, in *Parfums et odeurs dans l'Antiquité*, Lyon, 71-79.
- 118- Garnier, N., Frère, D., "Une archéologie de l'évanescent", **2008**, in *Parfums de l'Antiquité - La rose et l'encens en Méditerranée* Musée Royal de Mariemont, Lyon, 61-71.
- 119 - Hansson, M. C., Foley, B. P., "Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck", **2008**, *Journal of Archaeological Sciences*, 35 (5), 1169-1176.
- 120 - Barta, J. L., Moroe, C., Teisberg, J. E., Winters, M., Flanigan, K., Kemp, B. M., "One of the key characteristics of ancient DNA, low copy number, may be a product of its extraction", **2014**, *Journal of Archaeological Sciences*, 46, 281-289.
- 121 - Kemp, B. M., Malhi, R. S., McDonough, J., Bolnick, D. A., Eshleman, J. A., Rickards, O., Martínez-Labarga, C., Johnson, J. R., Lorenz, J. G., Dixon, E. J., Fifield, T. E., Heaton, T. H., Wolr, R., Smith, D. G., "Genetic analysis of early Holocene skeletal remains from Alaska and its implication for the settlement of the Americas", **2007**, *American Journal of Physical Anthropology*, 123, 605-621.
- 122 - Yoshikawa, H., Dogruman-AI, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N., "Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocytosis subtypes from fecal samples", **2011**, *Parasitol Research*, 109, 1045-1050.
- 123 - Demeke, T., Jenkins, G. R., "Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits", **2010**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1977-1990.
- 124 - Foley, B. P., Hansson, M. C., Kourkoumelis, D. P., Theodoulou, T. A., "Aspects of ancient Greek trade re-evaluated with amphora DNA evidence", **2012**, *Journal of Archaeological Science*, 39, 389-398.

- 125 - Bouters, R., Esnault, C., Salisbury, G. W., Ortavant, R., "Discrepancies in analysis of deoxyribonucleic acid in rabbit spermatozoa, involving feulgen staining (Feulgen-DNA) and ultraviolet light absorption (UV-DNA) measurements", **1967**, Journal of the Society for Reproduction and Fertility, 14, 355-363.
- 126 - Dotti, I., Bonin, S., "Quantification of nucleic acids", **2011**, in Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues", Amsterdam, 9783642178894, 75-76.
- 127 - Alakoç, Y. D., Aka, P. S., ""Orthograde entrance technique" to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure", **2009**, Forensic Science International, 188, 96-98.
- 128 - Maricic, T., Paabo, S., "Optimization of 454 sequencing library preparation from small amounts of DNA permits sequence determination of both DNA strands", **2009**, Biotechniques, 46, 51-57.
- 129 - Orlando, L., Metcalf, J. L., Alberdi, M. T., Telles-Antunes, M., Bonjean, D., Otte, M., Hanni, C., Cooper, A., "Revising the recent evolutionary history of equids using ancient DNA", **2009**, Proceedings of the National Academy Sciences, 109 (51), 21754-21759.
- 130 - Dieffenbach, C. W., Dveksler, G. S., "Introduction to PCR – Setting up a PCR laboratory", **2003**, in PCR primer a laboratory manual, New York, 0-87969-653-2, 5-14.
- 131- Benson, S. A., "A rapid procedure for isolation of DNA fragments from agarose gels", **1984**, BioTechniques, 2, 66-67.
- 132 - Sambrook, J., Green, M. R., "Analysis of DNA", **2012**, in Molecular Cloning: A laboratory manual Fourth Edition, New York, 978-1-936113-41-5, 94-194.
- 133 - Flores, N., Valle, F., Bolivar, F., Merino, E., "Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue", **1992**, BioTechniques, 13 (2), 203-205.
- 134 - Maxam, A. M., Gilbert, W., "A new method of sequencing", **1977**, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74 (2), 560-564.
- 135 - Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", **1977**, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74 (12), 5463-5467.
- 136 - Carvalho, C. G., Silva, D., "Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics", **2010**, Ciência Rural, 40 (3), 735-744.
- 137 - Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., Tairi, A., "A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis", **2008**, Nucleic Acid Research, 36 (4), 1-13.
- 138 - Shendure, J., "Next-generation DNA sequencing", **2008**, Nature Biotechnology, 26 (10), 1135-1145.
- 139 - www.supelcoanalytical.com, acessado em 10 de Abril de **2013**.
- 140 - Degens, E. T., Deuser, W. G., Haedrich, R. L., "Molecular structure and composition of fish otoliths*", **1969**, Marine Biology, 2, 105-113.

Bibliografia

141 - Cowey, C. B., "Amino acids requirements of fish: a critical appraisal of present value", **1994**, *Aquaculture*, 124, 1-11.

142 - Vaccaro, E., Ghisleni, M., Arnouldus-Huyzendveld, A., Grey, C., Bowes, K., Mackinnon, M., Mercuri, A. M., Pecci, A., Ontiveros, M. A. C., Rattigheri, E., Rinaldi, R., "Excavating the Roman peasant II: Excavations ta case nuove, ciniginaro (GR)", **2013**, Paper of the British School at Rome, 81, 129-179.

143 - Dembitsky, V. M., Shkrob, I., Rozentsvet, O. A., "Fatty acid amides from freshwater green alga *Rhizoclonium hieroglyphicum*", **2000**, *Phytochemistry*, 54, 965-967.

144 - McGovern, P. E., Mirzoian, A., Hall, G. R., "Ancient Egyptian herbal wines", **2009**, *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 106 (18), 7361-7366.

145 - Salque, M., "Was milk processed un ceramic pots? Organic residue analysis of European prehistoric cooking vessels", **2012**, in University of York, LeCHE book, UK, 978-0-901931-08-5, 127-141.

146 - Copley, M. S., Bland H. A., Rose, P., Horton, M., Evershed, R. P., "Gas chromatographic, mass spectrometric and stable carbon isotopes investigations of organic residues of plant oils and animal fats employed as illuminants in archaeological lamps from Egypt", **2005**, *Analyst*, 130, 860-871.

147 – Evershed, R. P., Dudd, S. N., Copley, M. S., Berstan, R., Stott, A. W., Mottram, H., Buckley, S. A., Crossman, Z., "Chemistry of archaeological animal fats", **2002**, *Accounts of Chemical Research*, 35, 660-668.

148 – Romanus, K., Poblome, J., Verbeke, K., Luypaerts, A., Jacobs, P., De Vos, D., Waelkens, M., "Na evaluation of analytical and interpretative methodologies for the extraction and identification of lipids associated with pottery sherds from the sites of Salgalassos Turkey", **2007**, *Archaeometry*, 49, 729-747.

149 – Cramp, L. J. E., Jones, J., Sheridan, A., Smyth, J., Whelton, H., Murville, J., Sharples, N., Evershed, R. P., "Immediate replacement of fishing with dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos", **2014**, *Proceedings of the Royal Society B*, 281, 1-8.

150 - Ferreira, E. S. B., Quye, A., McNab, H., Hulme, A. N., "Photo-oxidation products of Quercetin and Morin as markers of the characterization of natural flavonoid yellow dyes in ancient textiles", **2002**, *Dyes in History and Archaeology*, 18, 63-72.

151 - Michael, J. P., "Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids", **1999**, *Natural Products Report*, 16, 697-709.

152 - Preciado, M. P. S., **2004**, "El Yacimiento arqueológico de la Nogueira (Tudelilla, La Rioja)", in actas do III simpósio da Associação Internacional d História e Civilização da Vinha e do Vinho, Funchal, Madeira, 972-8263-42-2, 861-879.

153 - Zhang, X., Yang, W., Dong, C., "Levoglucozan formation mechanisms during cellulose pyrolysis", **2013**, *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 104, 19-27.

154 - Beaten, J., Jervis, B., De Vos, D., Waelkens, M., "Molecular evidence for the mixing of Meat, Fish and Vegetables in Anglo-Saxons coarseware from Hamwic, UK", **2013**, *Archaeometry*, 55 (6), 1150-1174.

- 155 - Bertin, M. J., Zimba, V., Beauchesne, K. R., Huncik, K. M., Moeller, P. D. R., "Identification of toxic fatty acid amides isolated from the harmful alga *Prymnesium parvum carter*", **2012**, *Harmful Algae*, *20*, 111-116.
- 156 - Kawasaki, W., Matsui, K., Akakabe, Y., Itai, N., Kajiwara, T., "Volatiles from *Zostera marina*", **1998**, *Phytochemistry*, *47 (1)*, 27-29.
- 157 - Heron, C., Nilsen, G., Stern, B., Craig, O., Nordby, C., "Application of lipid biomarker analysis to evaluate the function of "slab-lined pits" in Arctic Norway", **2010**, *Journal of Archaeological Sciences*, *37*, 2188-2197.
- 158 - Correia, V. H., Coroado, J., Fernandes, L. S., Ruivo, J., Triães, R., "Produção e difusão de cerâmicas industriais em Conímbriga e territórios limítrofes", **2004**, in *V Mesa Redonda Internacional sobre Lusitania Romana: Las comunicaciones*, por Gorges, Jean-Gérard, Cerrillo, Enrique e Nogáles Bassarrate, Madrid (Espanha), 297-320.
- 159 - Alarcão, J., "La cerámica commune locale et régionale", **1975**, in *Fouilles de Conímbriga VI*, Coimbra (Portugal), 376-386.
- 160 - Bates, L. S., "Rapid determination of free proline for water-stress studies", **1973**, *Plant and Soils*, *39*, 205-207.
- 161 - Correia, V. H., De Man, A., "Variação e constância na ocupação de Conímbriga e do seu território", in *Changing Landscapes: The impact of Roman towns in the Western Mediterranean*, **2010**, in *proceedings of the International Colloquium*, Castelo de Vide-Marvão (Portugal), 978-88-7849-055-0, 299-310.
- 162 - Aroke, U. O., Abdulkarin, A., Ogubunka, R. O., "Fourier-transformed Infrared Characterization of Kaolin, Granite, Bentonitem and Barite", **2013**, *Journal of Environmental Technology* *6 (1)*, 42-53.
- 163 - Kuzniarska-Biernacka, I., Silva, A. R., Carvalho, A. P., Pires, J., Freire, C., "Organo-Laponites as novel mesoporous support for Manganese (III) *salen* catalyst", **2005**, *Langmuir*, *21*, 10825-10834.
- 164 - Granizo, M. L., Blanco-Varela, M. T., Palomo, A., "Influence of the starting kaolin on alkali-activated materials based on metakaolin. Study of the reactions parameters by isothermal conduction calorimetry", **2000**, *Journal of Matter Science*, *35*, 6309-6315.
- 165- Kimpe, K., Jacobs, P. A., Waelkens, M., "Mass spectrometry methods prove the use of beeswax and ruminant fat in late Roman cooking pots", **2002**, *Journal of Chromatography A*, *968*, 151-160.
- 166 - Bonaduce, I., Andreotti, A., "Py-GC/MS of Organic Paint Binders", **2009**, in *Organic mass spectrometry in art and archaeology*, by Colombini, M. P., Modugno, F, University of Pisa, Italy, 978-0-470-51703-1, 303-326.
- 167 - Goni, I., Serrano, J., Saura-Calixto, F., "Bioaccessibility of β -carotene, lutein and lycopene from fruits and vegetables", **2006**, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *54 (15)*, 5382-5387.

Bibliografia

168 - Jerkovic, I., Hegić, G., Marijanović, Z., Bubalo, D., “Organic extractives from *Mentha spp. Honey* and the bee-Stomach: Methyl siringate, vomifoliol, terpenediol I, hotrienol and other compounds”, **2010**, *Molecules*, *15*, 2911-2974.

169 - Colmenero, R. A., “Lucus Augusti: A cidade romano-xermanica de fisterra ibérica. Xénese e evolución histórica”, **2011**, in Concello de Lugo, Lugo (Espanha), *978-84-92895-04-5*, 83-84.

170 - Colmenero, R. A., Cao, C. R., “Anastilosis virtual de “A domus do Mitreo de Lucus Avgvsti”, **2012**, *Virtual Archaeology Review*, *3* (5), 104-108.

171 - Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J. T., Machida, R. J., “A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish guts contents”, **2013**, *Frontiers in Zoology*, *10* (34), 1-14.

172 - Lobo, J., Costa, P. M., Teixeira, M. A. L., Ferreira, S. G., Costa, M. H., Costa, F. O., “Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans”, **2013**, *Biomed Central Ecology*, *13* (34), 1-8.

173 - Geller, J., Meyer, C., Parker, M., Hawk, H., “Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys”, **2013**, *Molecular Ecology Resources*, *13*, 851-861.

Anexos

Anexo 1

Receita de *Garum* e *Alec*

1. Colocar peixe debaixo de água a correr, intacto (sem remover guelras, entranhas, etc.).
2. Colocar o peixe juntamente com sal e ervas numa panela de um 1,5 L e cobrir o peixe com água, deixando-o a 5 cm da tona.
3. Ferver durante 15 min até o peixe ficar em polpa e esmagá-lo com uma colher de madeira. Continuar a ferver até o líquido ficar fino.
4. Deixar arrefecer e diferenciar a pasta viscosa (*Garum*) do líquido formado (*Alec*);
5. Transferir para vasos limpos.

Anexo 2

Extrações de ADN

A2.1 – Extração de ADN de tecidos biológicos modernos

1. Retirar pequenas alíquotas para pequenos eppendorfs de 1.5 mL;
2. Deixar secar ao ar durante algumas horas para que o etanol de conservação temporário da amostra evapore completamente;
3. Adicionar 350 µL de ML1 Buffer e 25 µL de Proteinase K. Vortexar;
4. Incubar durante a noite a 37 °C;
5. Adicionar 350 µL de clorofórmio: isoamil (2:1). Vortexar;
6. Centrifugar a 10 000 g por 2 minutos;
7. Transferir a fase aquosa dos eppendorfs para novos (evitar contacto com a fase orgânica); - eliminação de polissacarídeos e proteínas
8. Adicionar 300 µL de MBL Buffer e 10 µL de RNase. Vortexar;
9. Incubar a 70 °C por 10 minutos e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
10. Adicionar 300 µL de etanol 100%. Vortexar;
11. Inserir *Hibind DNA Minicoluna* (filtro) em tubos kit;
12. Adicionar 100 µL de NaOH 3M ao Hibind;
13. Centrifugar a 10 000 g por 1 minuto;
14. Descartar sobrenadante e utilizar tubo kit;
15. Inserir novo *Hibind* no tubo kit e adicionar 500 µL de HBC buffer;
16. Centrifugar a 10 000 g por 30 segundos;
17. Descartar e reutilizar o tubo kit;
18. Adicionar 700 µL de DNA wash buffer;
19. Centrifugar a 10 000 g por 1 minuto e descartar o sobrenadante. Reutilizar o tubo kit;
20. Centrifugar o filtro vazio a 10 000 g por 2 minutos para secar a membrana;
21. Transferir o filtro para eppendorfs novos e adicionar 50 µL de elution buffer pré-aquecido a 70 °C;
22. Deixar arrefecer a temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugar a 10 000 g por 1 minuto e guardar a -20 °C.

A-2.2 – Kit de extração e purificação Roche

1. Pulverizar a amostra com azoto líquido;
2. Adicionar 300 µL de binding buffer. Vortexar e incubar durante 1 hora;
3. Adicionar cerca de 150 µL de isopropanol. Vortexar;
4. Colocar filtro do kit no tubo kit e pipetar fase aquosa da amostra;
5. Centrifugar a 12 000 por 1 minuto e descartar o líquido;
6. Adicionar 200 µL de wash buffer, centrifugar e descartar o líquido;
7. Combinar filtros sujos com novos eppendorfs de 1.5 mL;
8. Adicionar 50 µL de elution buffer, centrifugar a 10 000 por 1 minuto;
9. Descartar filtros, fechar os eppendorfs e colocar a -20 °C.

A-2.3 – Kit de extração e purificação Roche modificado

1. Pulverizar a amostra com azoto líquido
2. Adicionar 300 µL de binding buffer e 15 µL de proteinase k
3. Vortexar e incubar durante 1 hora
4. Incubar durante a noite a 37 °C
5. Adicionar 300 µL de clorofórmio:isoamil (2:1)
6. Vortexar e centrifugar a 10 000 g por 2 minutos
7. Retirar a camada superior para eppendorfs de 1.5 mL e adicionar a mesma quantidade de etanol 100%
8. Transferir tudo para filtros, centrifugar e descartar o líquido
9. Lavar o filtro com 500 µL e descartar
10. Adicionar 50 µL de *ellution buffer* e guardar a -20 °C.

A-2.4 – Metodologia de extração e purificação “Foley”

1. Pulverizar a amostra com azoto líquido
2. Adicionar 800 µL de tampão de lise:

0,1M Tris HCl pH 8.5

0,005 M EDTA

0,2% SDS

0,2M NaCl

3. Adicionar 8 μL de proteinase k (digerir as DNAses)
4. Incubar a 56 $^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas
5. Vortexar de hora a hora
6. Centrifugar a 10 000 g durante 10 minutos e aproveitar sobrenadante para novos tubos
7. Adicionar 40 μL de NaAc (Precipitar DNA) e 400 μL de etanol (100%) frio (precipitar DNA)
8. Centrifugar a 10 000 g durante 10 minutos e descartar o líquido rapidamente
9. Adicionar 150 μL de etanol (70%)
10. Centrifugar a 10 000 g durante 10 minutos e descartar o líquido
11. Deixar eppendorfs abertos de forma a evaporar todo o etanol
12. Adicionar 50 μL de H_2O e ressuspender com a pipeta.