



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

**Análise isotópica de material
osteológico – uma contribuição para o
conhecimento da dieta romana na
região de Pax Julia (Beja)**

Patrícia Alexandra Calhau Saragoça

Orientação: Professora Doutora Cristina Dias

Doutora Ana Isabel Janeiro

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

**Análise isotópica de material
osteológico – uma contribuição para o
conhecimento da dieta romana na
região de Pax Julia (Beja)**

Patrícia Alexandra Calhau Saragoça

Orientação: Professora Doutora Cristina Dias

Doutora Ana Isabel Janeiro

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Agradecimentos

A concretização deste trabalho não seria possível sem a contribuição de várias pessoas e entidades, a quem quero expressar os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Prof.^a Cristina Dias, pela orientação, ajuda e disponibilidade demonstradas.

À minha orientadora, Doutora Ana Isabel Janeiro, pela ajuda e disponibilidade demonstradas, bem como pelos ensinamentos na área dos isótopos estáveis.

À Doutora Anne-France Maurer por toda a ajuda, disponibilidade e paciência demonstradas, bem como pelos ensinamentos sobre o estudo de restos osteológicos, principalmente a nível laboratorial.

Ao Laboratório HERCULES, da Universidade de Évora, pelas facilidades proporcionadas à realização deste trabalho.

Aos meus pais por todo o apoio moral e monetário, que tornaram possível todo o meu percurso académico.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial à Alexandra, ao Sérgio, ao Pedro e à Lucija pelo companheirismo e ajuda demonstrados.

A todos os “habitantes” do laboratório de difração de raio-x, pelo companheirismo e convívio que tornaram esta experiência mais alegre.

A todos os elementos pertencentes ao “Gangue da Marmita” pelo companheirismo, convívio e boa disposição, que tornaram as horas de almoço mais divertidas e alegres.

Aos meus colegas de mestrado, em especial ao Tiago e à Vânia, pela amizade e companheirismo.

E, ainda, a todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização e desenvolvimento deste trabalho.

Índice Geral

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	viii
Abreviaturas e Acrónimos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
1. Fundamento Teórico	1
1.1. Fracionamento Isotópico e Dieta	1
1.1.1. Isótopos	1
1.1.2. Fracionamento Isotópico	2
1.1.3. Fracionamento de Carbono e Azoto	4
1.1.4. Material Osteológico	16
1.2. Metodologia Analítica: Extração e Análise	19
1.3. Contextualização Arqueológica	22
2. Problemática e Objetivos	27
2.1. Problemática	27
2.2. Objetivo Geral	28
2.3. Objetivos Específicos	28
3. Metodologia	29
3.1. Estratégia	29
3.2. Diagrama do Trabalho	30
3.3. Procedimento Experimental	31
3.3.1. Amostras Arqueológicas das <i>Villae Romanas</i> no Monte da Cegonha e de São Cucufate	31
3.3.2. Métodos de Otimização da Extração de Colagénio	32
3.3.3. Extração de Colagénio das Amostras do Monte da Cegonha e de São Cucufate	37

3.3.4. Análise Isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ por EA-IRMS	37
3.4. Equipamento.....	40
3.5. Reagentes	40
4. Resultados e Discussão.....	43
4.1. A Dieta Romana.....	43
4.2. Seleção do Método de Extração de Colagénio.....	44
4.3. Análise Isotópica de Colagénio Extraído de Restos Osteológicos Arqueológicos das <i>Villae</i> Romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate	46
4.3.1. <i>Villa</i> Romana do Monte da Cegonha.....	47
4.3.2. <i>Villae</i> Romana de São Cucufate	54
4.3.3. Comparação das Análises Isotópicas dos Restos Osteológicos das duas <i>Villae</i> Romanas	59
5. Conclusões	65
6. Referências Bibliográficas.....	67
Anexos	75
Anexo I.....	77
Anexo II.....	81

Índice de Figuras

Figura 1 – Isótopos estáveis presentes na constituição do corpo humano (adaptado de Fry, 2006).	2
Figura 2 – Ciclo de Calvin: a) Principais etapas da assimilação de CO ₂ pelos organismos fotossintéticos; b) Estequiometria da assimilação de CO ₂ no ciclo de Calvin (adaptado de Nelson & Cox, 2004).	6
Figura 3 – Ciclo de Hatch-Slack (adaptado de Nelson & Cox, 2004).	8
Figura 4 – Diferenças entre o fracionamento isotópico do carbono nas plantas dos tipos C ₃ e C ₄ (adaptado de Brown & Brown, 2011).	10
Figura 5 – Ciclo do azoto (adaptado de Nelson & Cox, 2004).	12
Figura 6 – Efeito do nível trófico (adaptado de Janeiro, 2008).	13
Figura 7 – Níveis tróficos da cadeia alimentar em ambientes marinhos (adaptado de http://www.spc.int/oceanfish/en/ofpsection/ema/biological-research/74-trophic-dynamic/105-stomach-content-analyses , consultado em 11/06/2014).	14
Figura 8 – Diagrama geral da composição isotópica por nível trófico nas cadeias alimentares terrestres e marinhas (adaptado de O'Connell, 1996).	16
Figura 9 – Estrutura do tecido ósseo (adaptado de Amabis & Martho, 2004).	17
Figura 10 – Esquema representativo do funcionamento de um EA-IRMS para a medição de isótopos de carbono (adaptado de Muccio & Jackson, 2009).	21
Figura 11 – Localização das <i>villae</i> romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate (adaptado de http://www.rhizobia.uevora.pt/straincollection.html , consultado em 09/09/2014 e http://www.viladefrades.pt/portal/v3.0/mod_texto.asp?pag=34335267622766558199701219 , consultado em 09/09/2014).	24
Figura 12 – Vista aérea da <i>villa</i> romana do Monte da Cegonha (imagem gentilmente cedida por Rafael Alfenim).	25

Figura 13 – Vista geral e parcial das ruínas de São Cucufate (adaptado de http://www.igespar.pt/pt/patrimonio/pesquisa/geral/patrimonioimovel/detail/70270/ , consultado em 11-06-2014).....	25
Figura 14 – Diagrama representativo dos métodos 1, 2 e 3 utilizados na otimização da extração de colagénio.....	36
Figura 15 – Espectrómetro de massa de razões isotópicas Sercon acoplado a analisador elementar EuroVector da Unidade de Recursos Analíticos e de Isótopos Estáveis (SIAF) do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. .	38
Figura 16 – Espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Thermo Scientific, modelo Delta V Advantage acoplado a um analisador elementar da marca Thermo Scientific, modelo Flash 2000 do Laboratório de Espectrometria de Massa do Laboratório HERCULES.....	39
Figura 17 – Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras preparadas pelos diferentes métodos e respetivos desvios-padrão.....	45
Figura 18 – Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ das amostras preparadas pelos diferentes métodos e respetivos desvios-padrão.....	45
Figura 19 – Razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos da <i>villa</i> romana do Monte da Cegonha.	49
Figura 20 – Razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos faunísticos do Monte da Cegonha.....	52
Figura 21 – Comparação entre as razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos e faunísticos do Monte da Cegonha.	54
Figura 22 – Valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos de São Cucufate. .	55
Figura 23 – Valores isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos faunísticos de São Cucufate.....	57
Figura 24 – Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos e faunísticos de São Cucufate.....	59

Figura 25 – Comparação entre as razões isotópicas dos restos osteológicos humanos e faunísticos do Monte da Cegonha e de São Cucufate e respetivos valores médios e desvios-padrão.61

Figura 26 – Comparação dos resultados obtidos nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate com estudos realizados por Prowse, *et al.* (2004), Rutgers, *et al.* (2009), Chenery, *et al.* (2010), Redfern, *et al.* (2010), Müldner, *et al.* (2011), Pollard, *et al.* (2011), Stevens, *et al.* (2012) e Killgrove & Tykot, (2013) (H = Humanos, F = Fauna).62

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Isótopos de elementos de maior interesse na área da arqueologia biomolecular (adaptado de Brown & Brown, 2011).	1
Tabela 2 – Alguns materiais de intercomparação utilizados na medição de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$, distribuídos pela IAEA (adaptado de Carter, <i>et al.</i> , 2011).	4
Tabela 3 – Amostras de restos osteológicos humanos e faunísticos recolhidos nas <i>villae</i> romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate. No anexo I encontra-se informação antropológica mais detalhada sobre os restos osteológicos humanos e faunísticos das duas <i>villae</i> romanas.	32
Tabela 4 – Valores médios de rendimento, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, razão C:N e respetivos desvios-padrão das amostras utilizadas no processo de otimização da extração de colagénio.	46
Tabela 5 – Rendimento da extração de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de humanos da <i>villa</i> romana do Monte da Cegonha.....	50
Tabela 6 – Rendimento de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras faunísticas do Monte da Cegonha.	53
Tabela 7 – Rendimento de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de humanos de São Cucufate.	56
Tabela 8 – Rendimento de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras faunísticas de São Cucufate.....	58
Tabela 9 – Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de estudos realizados por Prowse, <i>et al.</i> (2004), Rutgers, <i>et al.</i> (2009), Chenery, <i>et al.</i> (2010), Redfern, <i>et al.</i> (2010), Müldner, <i>et al.</i> (2011), Pollard, <i>et al.</i> (2011), Stevens, <i>et al.</i> (2012) e Killgrove & Tykot, (2013).	63

Abreviaturas e Acrónimos

ATP – Adenosina Trifosfato

CF-IRMS – Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas em modo de Fluxo Contínuo (do inglês *Continuous-Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

d.C. – depois de Cristo

EA-IRMS – Análise Elementar acoplado com Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (do inglês *Elemental Analysis – Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia

FMC – Amostras de restos osteológicos faunísticos do Monte da Cegonha

FSC – Amostras de restos osteológicos faunísticos de São Cucufate

GC-IRMS – Cromatografia Gás-Líquido acoplado com Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (do inglês *Gas Chromatography – Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

HMC – Amostras de restos osteológicos humanos do Monte da Cegonha

HSC – Amostras de restos osteológicos humanos de São Cucufate

IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica (do inglês *International Atomic Energy Agency* – IAEA)

IRMS – Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (do inglês *Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês *National Institute of Standards and Technology*)

PDB – Estrutura de calcite interna de um fóssil, *Belemnitella americana* da formação do Cretácio Pee Dee na Carolina do Sul (do inglês *Pee Dee Belemnite*)

Per mil (‰) – Diferenças por mil

Plantas do tipo C₃ – Plantas cuja via de fotossíntese segue o ciclo de Calvin

Plantas do tipo C₄ – Plantas cuja via de fotossíntese segue o ciclo de Hatch-Slack

Plantas do tipo CAM – Plantas cuja via de fotossíntese segue o Metabolismo Ácido das Crassuláceas (do inglês *Crassulacean Acid Metabolism*)

RuBisCO – Ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase

RuBP – Ribulose 1,5-difosfato (do inglês *Ribulose 1,5-bisphosphate*)

SIIAF – Unidade de Recursos Analíticos e de Isótopos Estáveis (do inglês *Stable Isotopes and Instrumental Analysis Facility*)

SMOW – Padrão da Água Média do Oceano (do inglês *Standard Mean Ocean Water*)

UF – Ultrafiltração

VPDB – Vienna Pee Dee Belemnite (ver PDB)

VSMOW – Vienna Standard Mean Ocean Water (ver SMOW)

Wt.% – Peso por cento (do inglês *weight percent*)

Resumo

Neste trabalho são apresentados os resultados da análise isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de material osteológico arqueológico humano e faunístico das *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate, localizadas na região de Pax Julia (Beja), para obter informação sobre a dieta das populações tardo-antigas destas *villae*. Apesar da proximidade geográfica, os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ das duas populações são estatisticamente diferentes, provavelmente devido às diferenças observadas nos valores isotópicos da respetiva fauna, usada na alimentação. O valor elevado de $\delta^{13}\text{C}$ dos herbívoros domesticados sugere que haveria alguma contribuição de plantas do tipo C_4 (milho painço) na alimentação dos animais, enquanto os valores elevados de $\delta^{15}\text{N}$ indicam a aplicação de estrume nos solos, mais intenso no Monte da Cegonha. Os resultados obtidos sugerem que as duas populações tinham uma dieta semelhante, à base de plantas do tipo C_3 e de carne e subprodutos animais.

Isotopic analysis of osteological material – a contribution to the knowledge of the Roman diet in the region of Pax Julia (Beja)

Abstract

The isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of osteological material, both human and animal, from the roman *villae* of Monte da Cegonha and S. Cucufate, located in the Pax Julia (Beja) region, was pursued in order to gain some insight into the diet of the palaeochristian population of these two *villae*. Despite their close geographical location, the average values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the two populations are statistically different, probably due to differences observed in the isotopic values of the respective fauna, used as a food source. The high $\delta^{13}\text{C}$ value observed for the domesticated herbivores is likely due to a small contribution of C_4 plants (millet) in their diet, while the high $\delta^{15}\text{N}$ values results from addition of manure to the soils, more intense in Monte da Cegonha. The results suggest that C_3 plants were the basis of the population diet, complemented with some terrestrial meat and its subproducts.

1. Fundamento Teórico

1.1. Fracionamento Isotópico e Dieta

1.1.1. Isótopos

O termo isótopo foi introduzido por Frederick Soddy e Margaret Todd em 1913 e provém do grego *ísos* (mesmo) e *tópos* (lugar). Isótopos são átomos de um dado elemento que têm igual número atômico e diferente número de massa, ocupando a mesma posição na tabela periódica. Por outras palavras, são elementos que partilham o mesmo número de prótons e de eletrões, mas diferem no número de neutrões. Os isótopos mais utilizados na área da arqueologia biomolecular (estudo de biomoléculas que visa responder a questões arqueológicas) são o carbono, o azoto, o oxigénio e o estrôncio. O carbono, por exemplo, tem três isótopos naturais, cada um com seis prótons mas com seis, sete e oito neutrões, respetivamente (tabela 1) (Umbelino, 2006, Janeiro, 2008, Brown & Brown, 2011, Fjellström, 2011).

Os isótopos podem ser radioativos ou estáveis. Os isótopos estáveis são definidos como sendo energeticamente estáveis e não sofrem decaimento (não se decompõem), ao contrário dos isótopos radioativos. Na natureza predominam as formas dos isótopos mais leves, e as suas abundâncias relativas para os elementos interesse deste trabalho encontram-se referidas na tabela 1 (Umbelino, 2006, Sulzman, 2007, Brown & Brown, 2011).

Tabela 1 – Isótopos de elementos de maior interesse na área da arqueologia biomolecular (adaptado de Brown & Brown, 2011).

Elemento	Número de Massa	Abundância na natureza (%)
Carbono	12	98,93
	13	1,07
	14	Uma parte por trilião
Azoto	14	99,64
	15	0,36
Oxigénio	16	99,76
	17	0,04
	18	0,20
Estrôncio	84	0,56
	86	9,86
	87	7,00
	88	82,58

1.1.2. Fracionamento Isotópico

Embora os isótopos de um dado elemento tenham propriedades químicas semelhantes, as diferenças de massa afetam o seu comportamento durante processos físicos e químicos, conduzindo a um fracionamento isotópico que é definido como a variação nas razões da abundância dos isótopos, originado por processos físicos e químicos. Existem dois tipos principais de fracionamento isotópico: o fracionamento de equilíbrio e o fracionamento cinético. O fracionamento de equilíbrio resulta da troca diferencial de isótopos entre substâncias químicas (reagentes *versus* produtos) ou entre duas fases físicas (por exemplo, fase gasosa *versus* fase líquida) que estão em equilíbrio uma com a outra. Um exemplo deste tipo de fracionamento é a condensação da água da chuva nas nuvens. O fracionamento cinético, o mais importante para a área da arqueologia biomolecular, resulta das diferenças de massa atômica dos isótopos na velocidade de uma reação, onde os produtos da reação se tornam enriquecidos nos isótopos mais leves. Neste tipo de fracionamento ocorrem processos físicos ou químicos irreversíveis, tais como a evaporação da água, difusão de gases, reações de dissociação e reações enzimáticas (Umbelino, 2006, Sulzman, 2007, Janeiro, 2008, Brown & Brown, 2011, Sponheimer, *et al.*, 2014).

Um humano é composto maioritariamente por isótopos leves e uma pequena quantidade de isótopos pesados. Como o corpo humano é constituído maioritariamente por água, num indivíduo com cerca de 50 Kg, os isótopos de hidrogénio e de oxigénio representam mais de 35 Kg. Em seguida estão os isótopos de carbono que representam mais de 11 Kg, os isótopos de azoto (>1 Kg) e os de enxofre (~230 g) (figura 1) (Fry, 2006, Sulzman, 2007, Fjellström, 2011).

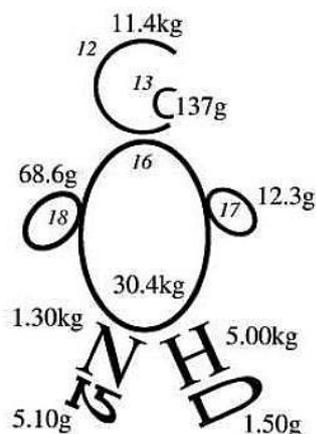


Figura 1 – Isótopos estáveis presentes na constituição do corpo humano (adaptado de Fry, 2006).

O fracionamento isotópico tem sido investigado através de técnicas isotópicas, principalmente pela espectrometria de massa de razões isotópicas (do inglês *Isotope Ratio Mass Spectrometry* – IRMS) onde são medidas razões isotópicas, através da comparação entre a razão isotópica do composto a medir e a razão isotópica de um composto de referência. Por convenção, as razões isotópicas são apresentadas como a diferença relativa delta (δ) que expressa, em *per mil* (diferenças por mil) (‰), o desvio das razões isotópicas da amostra relativamente a substâncias de referência ou padrão, através da seguinte expressão:

$$\delta (\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1.1)$$

onde R corresponde à razão isotópica entre o isótopo estável mais pesado e o isótopo estável mais leve. A razão isotópica para o carbono, por exemplo, representa-se por $\delta^{13}\text{C}$ e é definida pela seguinte expressão:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{amostra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{padrão}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1.2)$$

Um valor de $\delta^{13}\text{C}$ positivo significa que o teor de ^{13}C na amostra é enriquecido em comparação com o padrão, ou, pelo contrário, o teor de ^{12}C na amostra é empobrecido relativamente ao padrão utilizado. Um valor de $\delta^{13}\text{C}$ negativo indica um empobrecimento em ^{13}C e um enriquecimento em ^{12}C . Para facilitar a comparação de resultados e eliminar qualquer desvio ou erro sistemático, estabeleceu-se um acordo universal sobre a identidade dos padrões contra os quais os resultados das amostras seriam comparados. Originalmente, para o carbono, o padrão utilizado era o PDB (do inglês *Pee Dee Belemnite* – estrutura de calcite interna de um fóssil, *Belemnitella americana* da formação do Cretácio Pee Dee na Carolina do Sul), para o oxigénio utilizava-se o padrão SMOW (do inglês *Standard Mean Ocean Water*) e para o azoto utilizava-se ar atmosférico, representado pela sigla AIR (do inglês *Ambient Inhalable Reservoir*). Estipulou-se que todos estes padrões tinham valores de $\delta=0\text{‰}$. Contudo, o padrão PDB está esgotado há muito tempo e o padrão SMOW nunca existiu fisicamente, o que levou a Agência Internacional de Energia Atómica (do inglês *International Atomic Energy Agency* – IAEA), com sede em Viena de Áustria, a preparar novos materiais de referência que definem a escala $\delta=0\text{‰}$, sendo estes identificados pelo prefixo “V”, como são o caso do VPDB e do VSMOW. Dada a enorme necessidade dos laboratórios, a IAEA preparou vários padrões, nomeadamente sais de

nitrito e amónio, para a determinação das razões isotópicas do azoto, pois a utilização de ar atmosférico requer que o azoto seja isolado da atmosfera sem fracionamento. O VSMOW é designado como material primário, sendo que cada laboratório pode receber uma porção deste material apenas de três em três anos, de modo a que este esteja disponível durante várias décadas. Existem ainda outros materiais, naturais ou sintéticos, distribuídos pela IAEA que são os materiais de intercalibração e que resultam de ensaios interlaboratoriais (tabela 2). Uma vez que os materiais de referência ou de intercomparação são de custo elevado, normalmente os laboratórios que usam técnicas isotópicas têm os seus padrões de trabalho internos (padrões *in house*) que são calibrados contra materiais de referência ou de intercomparação adquiridos à IAEA ou a outra instituição equivalente como é o caso do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês *National Institute of Standards and Technology* – NIST) (Schoeninger & Moore, 1992, Umbelino, 2006, München, 2007, Sulzman, 2007, Janeiro, 2008, Brown & Brown, 2011, Carter, *et al.*, 2011).

A determinação de razões isotópicas de isótopos estáveis é utilizada em diversas áreas, tais como geologia, ciências forenses, arqueologia, hidrologia, medicina, agricultura, antropologia, entre muitas outras. Na área da arqueologia biomolecular tem sido utilizada na reconstrução da dieta humana pré-histórica, principalmente através dos isótopos de carbono e azoto (Ambrose, 1990, Janeiro, 2008).

Tabela 2 – Alguns materiais de intercomparação utilizados na medição de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$, distribuídos pela IAEA (adaptado de Carter, *et al.*, 2011).

Elemento	Material de Referência	δ (‰)
Carbono	IAEA-600 Cafeína	-27,771
	IAEA-CH-6 Sacarose	-10,499
	IAEA-CH-7 Polietileno	-32,151
Azoto	IAEA-600 Cafeína	+1,0
	IAEA-N-1 Sulfato de Amónio	+0,4
	IAEA-N-2 Sulfato de Amónio	+20,3
Oxigénio	IAEA-602 Ácido Benzoico	+71,4±0,5
	GISP Água	-24,76±0,09
	NBS-18 Calcite	-23,2±0,1

1.1.3. Fracionamento de Carbono e Azoto

Na área da arqueologia biomolecular, os fracionamentos isotópicos mais importantes que ocorrem na natureza são os que permitem estudar os tipos de alimentos ingeridos pelos humanos no passado, com base no princípio de que a composição isotópica dos alimentos consumidos está refletida nos tecidos do consumidor. Esse estudo

depende quase exclusivamente da análise de isótopos estáveis de carbono (^{12}C e ^{13}C) e de azoto (^{14}N e ^{15}N), permitindo a identificação do consumo de diferentes tipos de plantas, no caso do carbono, bem como de alimentos de origem marinha e terrestre, no caso do azoto (Umbelino, 2006, Keenleyside, *et al.*, 2009, Brown & Brown, 2011).

Todas as plantas terrestres têm como fonte de carbono o dióxido de carbono atmosférico (CO_2). A assimilação do dióxido de carbono pelas plantas através da fotossíntese conduz a um fracionamento isotópico cinético, ocorrendo uma diminuição do isótopo pesado ^{13}C , o que significa que o ^{12}C é preferencialmente incorporado nos tecidos das plantas em relação ao ^{13}C . O fracionamento do carbono vai depender do tipo de processo utilizado pela planta para fixar o CO_2 . Existem três diferentes tipos de processos, com base no modo de assimilação do CO_2 : o ciclo de Calvin, o ciclo de Hatch-Slack e o ciclo do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (do inglês *Crassulacean Acid Metabolism* – CAM) (Umbelino, 2006, Janeiro, 2008).

As plantas que utilizam o ciclo de Calvin para assimilar o CO_2 designam-se por plantas do tipo C_3 , visto que o CO_2 assimilado dá origem a um composto intermediário com três átomos de carbono, o 3-fosfoglicerato. Neste ciclo podem ser consideradas três etapas principais: fixação, redução e regeneração do substrato inicial. Na primeira etapa ocorre uma reação de fixação do carbono, onde a condensação de CO_2 com um aceitador com cinco átomos de carbono, a ribulose 1,5-difosfato (do inglês *Ribulose 1,5-bisphosphate* - *RuBP*), dá origem a duas moléculas de 3-fosfoglicerato. A enzima que catalisa a incorporação de CO_2 numa forma orgânica é a ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase, vulgarmente designada como RuBisCO. Esta enzima catalisa a ligação covalente do CO_2 à RuBP (cinco carbonos) e a clivagem do produto intermediário (seis carbonos) para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato. Na segunda etapa, o 3-fosfoglicerato formado na etapa anterior é convertido a gliceraldeído 3-fosfato. A enzima 3-fosfoglicerato cínase catalisa a transferência do grupo fosfato do ATP para o 3-fosfoglicerato, originando 1,3-difosfoglicerato, o qual é reduzido a triose-fosfato (gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato), numa reação envolvendo o NADPH. Na terceira e última etapa, a triose-fosfato sofre uma série de isomerizações, condensações e rearranjos resultando na conversão de cinco moléculas de triose-fosfato em três moléculas de ribulose 5-fosfato. Por fim, a fosforilação desta pelo ATP regenera a RuBP, completando o ciclo (figura 2). As plantas do tipo C_3 correspondem à maioria das plantas das regiões temperadas, tais como Europa, Ásia e América do Norte, e incluem trigo, cevada, arroz, centeio, a maioria das frutas e legumes, ervas, árvores e arbustos (Dupras,

et al., 2001, Nelson & Cox, 2004, Umbelino, 2006, Janeiro, 2008, Quintas, *et al.*, 2008, Muccio & Jackson, 2009, Brown & Brown, 2011).

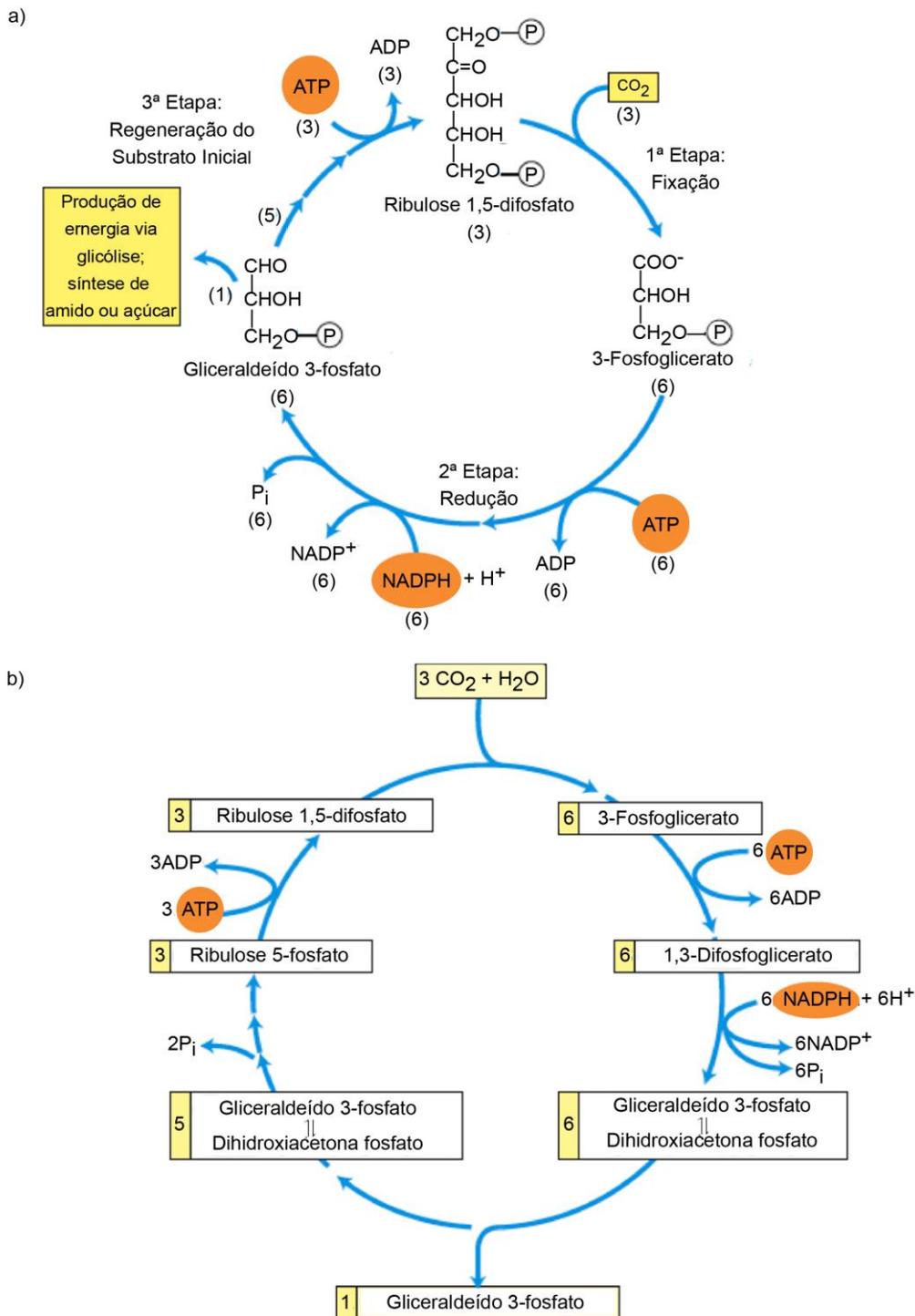


Figura 2 – Ciclo de Calvin: a) Principais etapas da assimilação de CO₂ pelos organismos fotossintéticos; b) Estequiometria da assimilação de CO₂ no ciclo de Calvin (adaptado de Nelson & Cox, 2004).

Muitas das plantas que crescem nas regiões tropicais e subtropicais, tais como milho, milho painço, cana-de-açúcar e sorgo, assimilam o CO₂ através do ciclo de Hatch-Slack e são designadas por plantas do tipo C₄, pois os primeiros compostos intermediários sintetizados a partir do CO₂ são constituídos por quatro átomos de carbono, o malato e o aspartato. Este tipo de processo está associado à existência de dois tipos diferentes de células dentro da folha: as células do mesófilo e as células da bainha perivascular. Nestas plantas, o primeiro composto intermediário formado a partir da assimilação do ¹⁴CO₂ é o oxaloacetato. Esta reação ocorre no citosol das células do mesófilo e é catalisada pela fosfoenolpiruvato carboxilase, cujo substrato é o ião hidrogenocarbonato (HCO₃⁻). O oxaloacetato formado é reduzido a malato com dispêndio de NADPH ou convertido a aspartato por transaminação. O malato ou o aspartato formados nas células do mesófilo são transferidos para as células da bainha perivascular, sendo que o malato sofre oxidação e descarboxilação oxidativa, obtendo-se piruvato e CO₂ pela ação da enzima málica. O aspartato é reconvertido a oxaloacetato por transaminação e reduzido a malato, com libertação de CO₂ pela enzima málica ou pela fosfoenolpiruvato carboxicinase. O piruvato formado pela descarboxilação do malato nas células da bainha perivascular é transferido de volta para as células do mesófilo, onde é convertido a fosfoenolpiruvato pela ação da piruvato ortofosfato dicinase (figura 3). O CO₂ libertado pela enzima málica ou pela fosfoenolpiruvato carboxicinase é reduzido, pela ação da RuBisCO, através das mesmas reações que ocorrem no ciclo de Calvin, e é fixado em 3-fosfoglicerato. Em suma, as células do mesófilo efetuam a assimilação do CO₂ através do ciclo de Hatch-Slack e as células da bainha perivascular sintetizam amido e sacarose através do ciclo de Calvin (Nelson & Cox, 2004, Umbelino, 2006, Quintas, *et al.*, 2008, Keenleyside, *et al.*, 2009).

Por último surge o ciclo do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). Este termo provém do facto de ter sido na família das *Crassulaceae* que o ciclo foi inicialmente descoberto e por ser caracterizado pela acumulação de ácido durante a noite. As plantas que seguem este ciclo são designadas de plantas do tipo CAM, tais como cactos, ananás, baunilha e orquídea, e são nativas de ambientes muito quentes e secos. Neste ciclo, as plantas fixam o CO₂ durante a noite, quando o ar é mais frio e húmido, e os estomas abrem para permitir a entrada do CO₂ que é fixado em oxaloacetato pela ação da fosfoenolpiruvato carboxilase. O oxaloacetato é reduzido a malato e armazenado nos vacúolos (ciclo de Hatch-Slack). Durante o dia os estomas fecham, impedindo perdas de água, e o CO₂ armazenado sob a forma de malato é libertado. Este CO₂ é assimilado pela ação da RuBisCO (ciclo de Calvin) (Nelson & Cox, 2004, Janeiro, 2008, Muccio & Jackson, 2009).

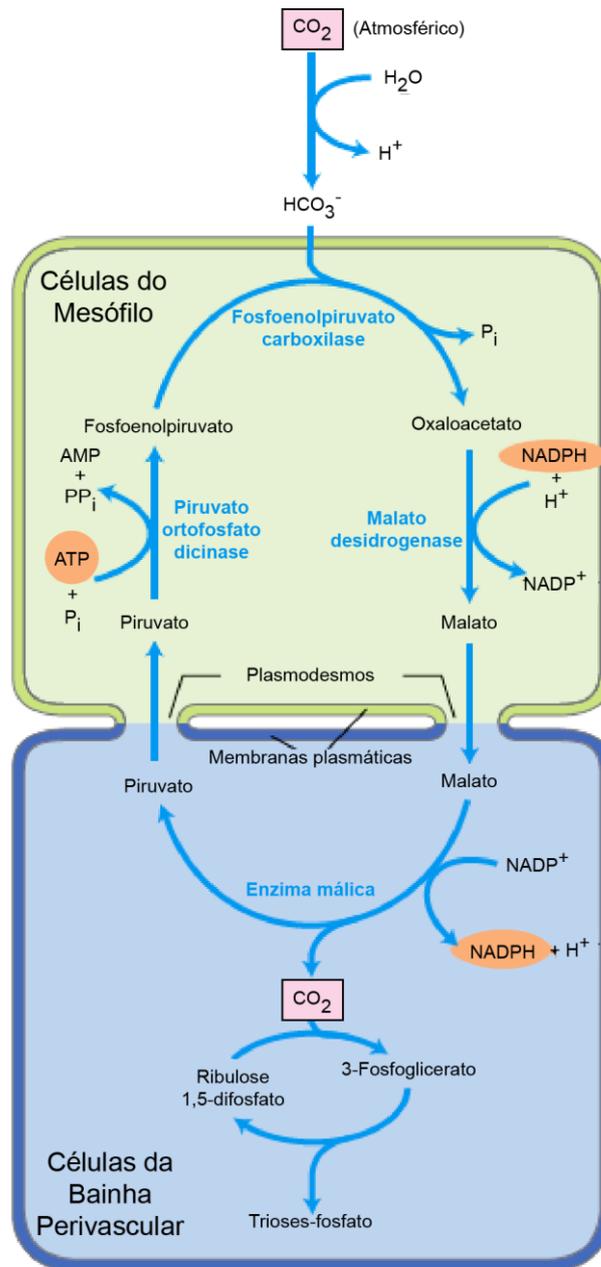


Figura 3 – Ciclo de Hatch-Slack (adaptado de Nelson & Cox, 2004).

Com base nas diferenças químicas existentes entre os três processos anteriormente referidos, são observados diferentes graus de fracionamento isotópico entre as plantas dos tipos C_3 , C_4 e CAM. Durante a entrada de CO_2 atmosférico nas plantas ocorre um enriquecimento inicial em ^{12}C , o que leva o isótopo mais leve (^{12}C) a difundir mais rapidamente através dos poros microscópicos das superfícies exteriores das folhas das plantas. Nas plantas do tipo C_3 ocorre um enriquecimento subsequente em ^{12}C , aquando da conversão das moléculas de CO_2 , que contêm ^{12}C , em glicose pela ação da

RuBisCO. Devido aos dois enriquecimentos em ^{12}C referidos, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos tecidos das plantas do tipo C_3 são inferiores aos valores do CO_2 atmosférico, ou seja, há uma discriminação contra o ^{13}C presente no CO_2 atmosférico. Considera-se que o valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico é de -7‰ mas, nos tecidos das plantas do tipo C_3 o valor de $\delta^{13}\text{C}$ é, em média, $-26,5\text{‰}$, com um intervalo de -24‰ a -36‰ . Este valor vai depender ainda, para além do fracionamento isotópico introduzido pelo ciclo fotossintético característico do tipo de planta, de fatores ambientais tais como temperatura, humidade relativa, duração do dia, disponibilidade de água, intensidade da luz solar, pressão parcial do CO_2 e disponibilidade de nutrientes. Nas plantas do tipo C_4 , como o CO_2 assimilado é concentrado nas células do mesófilo antes da sua utilização pela RuBisCO, o CO_2 atmosférico é praticamente todo convertido em açúcar, não havendo um enriquecimento no isótopo mais leve. Por outras palavras, as plantas do tipo C_4 discriminam menos contra o ^{13}C , ocorrendo apenas o fracionamento resultante da absorção do CO_2 atmosférico, que corresponde a um valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ de $-12,5\text{‰}$, com um intervalo de -9‰ a -14‰ (figura 4). As plantas do tipo CAM apresentam um valor de $\delta^{13}\text{C}$ intermédio em relação às plantas dos tipos C_3 e C_4 . Como consequência, as diferenças entre o fracionamento isotópico nas plantas dos tipos C_3 e C_4 permitem inferir os tipos de alimentos ingeridos pelos humanos no passado. Estas diferenças refletem-se ao longo da cadeia alimentar quando as plantas são consumidas pelos animais e pelos seres humanos e utilizadas por estes na formação dos seus tecidos o que, por outras palavras, significa que “cada um é aquilo que come”. Os processos metabólicos envolvidos na fixação do carbono nos tecidos animais, nomeadamente no colagénio (proteína constituinte de qualquer tecido conjuntivo animal, designadamente o tecido ósseo), induzem um aumento de $\delta^{13}\text{C}$ de $+5\text{‰}$, o que significa que o colagénio é enriquecido em $+5\text{‰}$ em relação à dieta do indivíduo. Assim sendo, animais que tenham uma dieta baseada principalmente em plantas do tipo C_3 devem ter valores $\delta^{13}\text{C}$ de colagénio ósseo de, em média, $-21,5\text{‰}$, enquanto que aqueles que consomem plantas do tipo C_4 devem ter valores de $\delta^{13}\text{C}$ de, em média, $-7,5\text{‰}$. Há também um fator de fracionamento adicional de cerca de $+1\text{‰}$ entre o colagénio ósseo dos carnívoros e dos herbívoros (Tykot, 2006, Umbelino, 2006, München, 2007, Lee-Thorp, 2008, Keenleyside, *et al.*, 2009, Muccio & Jackson, 2009, Brown & Brown, 2011, Carter, *et al.*, 2011, Rand, 2011).

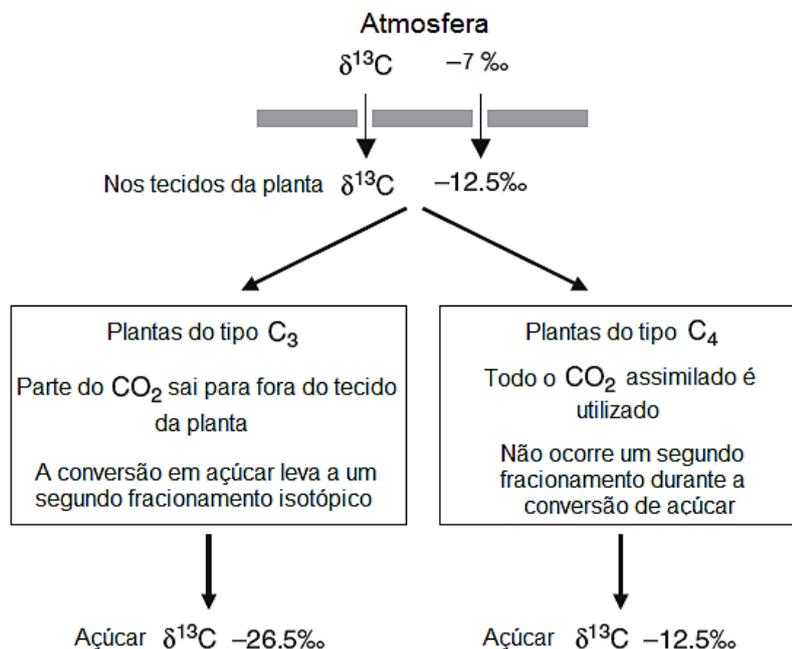


Figura 4 – Diferenças entre o fracionamento isotópico do carbono nas plantas dos tipos C₃ e C₄ (adaptado de Brown & Brown, 2011).

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas plantas podem ser determinados pela via fotossintética mas também pela fonte primária de carbono. No ambiente marinho a fotossíntese é realizada por organismos, tais como algas marinhas e fitoplâncton, principalmente através do ciclo de Calvin. Contudo, o substrato de carbono já não é o CO₂ atmosférico mas sim o bicarbonato dissolvido, que é enriquecido em ¹³C em comparação com a atmosfera, tendo por isso um valor mais positivo de $\delta^{13}\text{C}$, 0‰. Assim, os alimentos marinhos, como o peixe, os mamíferos marinhos e os frutos do mar, podem ser distinguidos dos alimentos terrestres pelo seu enriquecimento de cerca de +7‰ em ¹³C. Nos seres humanos, uma dieta marinha corresponde a um valor de $\delta^{13}\text{C}$ de, em média, -16‰, podendo variar de acordo com a espécie e o local. Este valor é semelhante ao valor de $\delta^{13}\text{C}$ das plantas do tipo C₄, tendo em conta que estes valores médios podem ser variáveis, o que pode dificultar a interpretação dos resultados. Nesta situação, é essencial combinar a análise de isótopos estáveis de carbono com a análise de isótopos estáveis de azoto para uma melhor interpretação das dietas do passado (Umbelino, 2006, Knudson, *et al.*, 2007, Keenleyside, *et al.*, 2009, Brown & Brown, 2011, Rand, 2011).

Os isótopos estáveis de azoto são fundamentais para a distinção entre uma dieta à base de plantas ou de animais marinhos e terrestres, especialmente em zonas costeiras. O

azoto é um dos elementos mais abundantes nos tecidos vivos e é constituinte de várias biomoléculas, como por exemplo os aminoácidos. O ar atmosférico constitui a principal fonte de azoto (N_2). Os microrganismos possuem um sistema enzimático complexo, designado de complexo nitrogenase e constituído pela dinitrogenase redutase e dinitrogenase, e têm a capacidade de fixar o N_2 . A amónia é o principal produto desta fixação, podendo ser utilizada pelos organismos (diretamente ou após a sua conversão em compostos azotados, tais como nitritos, nitratos e aminoácidos), sendo este processo catalisado pela forma reduzida da enzima dinitrogenase. Algumas bactérias nitrificantes, como as dos géneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, obtêm energia através da oxidação de amónia a nitrito (NO_2^-) e de nitrito a nitrato (NO_3^-), sendo este processo conhecido por nitrificação. As plantas e muitas bactérias podem assimilar o nitrato e reduzi-lo a nitrito por ação das nitrito e nitrato redutases. A amónia resultante é incorporada em aminoácidos pelas plantas. Quando os organismos morrem ocorre degradação das suas proteínas por bactérias devolvendo a amónia ao solo, que posteriormente poderá ser reconvertida em nitrito e nitrato pelas bactérias nitrificantes. Algumas bactérias podem ainda converter nitrato em N_2 , em condições anaeróbias, num processo denominado de desnitrificação. A este conjunto de reações bioquímicas dá-se o nome de ciclo do azoto, que assegura a recuperação e reutilização do azoto biologicamente disponível (figura 5) (Nelson & Cox, 2004, Umbelino, 2006, Janeiro, 2008, Quintas, *et al.*, 2008, Rand, 2011).

A razão isotópica deste elemento nos organismos vivos vai depender do processo de fixação do azoto atmosférico. As plantas terrestres podem ser divididas em dois grupos: as plantas leguminosas e as plantas não-leguminosas. As plantas leguminosas (ervilhas, favas, feijão, etc.) fixam diretamente o N_2 e apresentam valores de $\delta^{15}N$ próximos de 0‰, ou seja, valores semelhantes ao da atmosfera. As plantas não-leguminosas, que englobam a maioria das plantas, apresentam valores de $\delta^{15}N$ mais positivos do que as leguminosas, visto que dependem do azoto presente no solo sob a forma de nitrato, ou seja, dependem de compostos azotados já fracionados. Estas plantas apresentam valores de $\delta^{15}N$ de cerca de +3‰ sendo estes valores incorporados ao longo da cadeia alimentar. Os carnívoros apresentam valores de $\delta^{15}N$ +3‰ mais positivos do que os herbívoros por eles consumidos, que por sua vez, apresentam valores de $\delta^{15}N$ +3‰ mais positivos do que as plantas que consomem, o que significa que ao longo da cadeia alimentar ocorre um incremento de +3‰ por cada nível trófico (figura 6). Este fenómeno é conhecido por efeito do nível trófico (Tykot, 2004, Prowse, *et al.*, 2005, Umbelino, 2006, München, 2007, Janeiro, 2008, Quintas, *et al.*, 2008, Keenleyside, *et al.*, 2009, Rand, 2011, Rand, *et al.*, 2013).

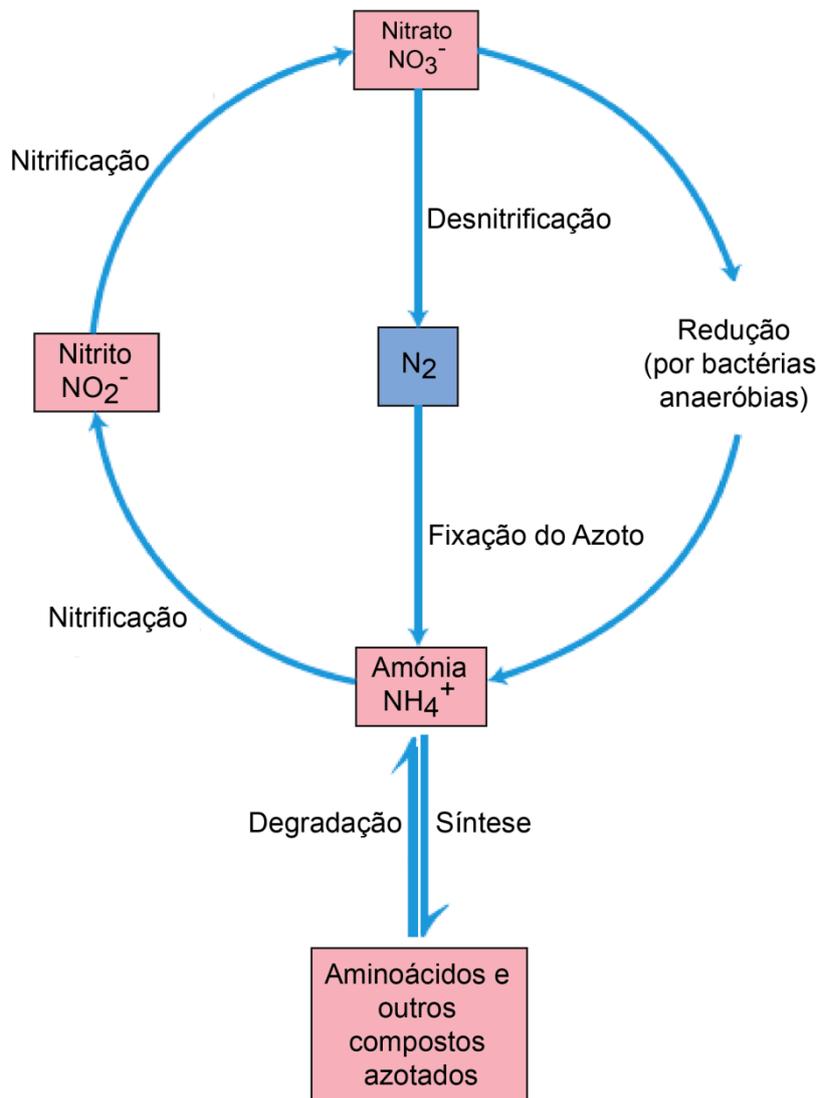


Figura 5 – Ciclo do azoto (adaptado de Nelson & Cox, 2004).

O azoto presente nos aminoácidos, incorporado pelas plantas através do ciclo do azoto, vai assim ser parte constituinte dos tecidos animais, aquando da transferência do azoto de plantas para animais ou entre animais. Este enriquecimento em ^{15}N ocorre devido aos efeitos do fracionamento isotópico observados durante a transaminação dos aminoácidos e também pelo fracionamento resultante da produção e excreção de ureia, que é o principal produto final da excreção de azoto no organismo dos mamíferos, sendo sintetizada pelo ciclo da ureia. A amónia produzida durante o processo de degradação de aminoácidos é tóxica para os organismos, sendo excretada por estes, visto que não é utilizada na biossíntese de novos aminoácidos e outros compostos azotados. A amónia pode ser excretada sob a forma de ácido úrico ou sob a forma de ureia. A maioria dos

mamíferos terrestres excreta a amónia sob a forma de ureia. A amónia é depositada nas mitocôndrias dos hepatócitos (células hepáticas) e convertida em ureia, que posteriormente entra na corrente sanguínea, é conduzida aos rins e excretada na urina. Os herbívoros terrestres e os carnívoros apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ de, em média, +5‰ e +8‰, respetivamente. Os seres humanos que consomem plantas terrestres e animais apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ de +5 a +12‰ no colagénio ósseo (Nelson & Cox, 2004, Tykot, 2004, Umbelino, 2006, München, 2007, Quintas, *et al.*, 2008).

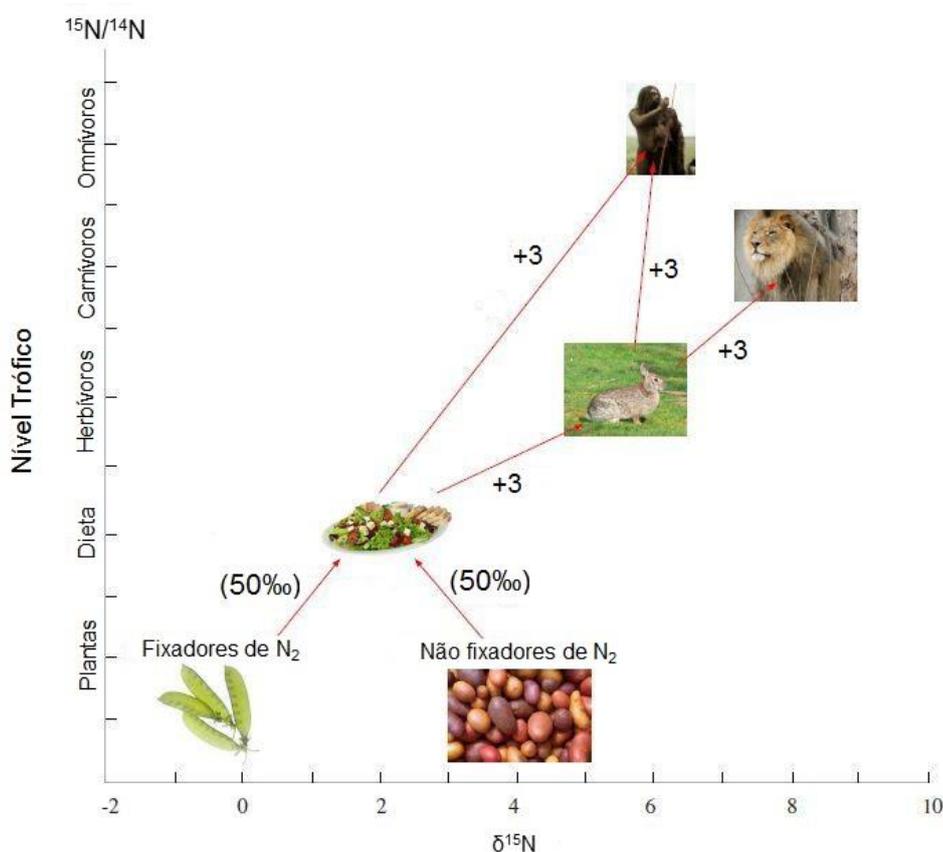


Figura 6 – Efeito do nível trófico (adaptado de Janeiro, 2008).

O incremento dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em +3‰ ao longo da cadeia alimentar não é exclusivo dos herbívoros terrestres e carnívoros. Este incremento pode também ser observado nos ambientes marinhos e conduz a um maior enriquecimento em ^{15}N no topo da cadeia alimentar devido a um maior número de níveis tróficos (figura 7), em relação às plantas terrestres. Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nos ambientes marinhos são mais positivos do que os valores das plantas terrestres, devido sobretudo à desnitrificação que ocorre nestes ambientes. Em média, as algas marinhas apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ +4‰ mais positivos

do que as plantas terrestres, com exceção das cianobactérias (algas caracterizadas por uma coloração azulada) que fixam o N_2 dissolvido na água e apresentam valores de $\delta^{15}N$ de aproximadamente 0‰. Os carnívoros marinhos que se encontram no topo da cadeia alimentar apresentam valores de $\delta^{15}N$ superiores a +12‰. Os seres humanos que têm por base uma dieta exclusivamente marinha registam os valores de $\delta^{15}N$ nos seus tecidos, nomeadamente no colagénio ósseo, apresentando um valor médio de +16‰, com um intervalo de +12‰ a +22‰. Se a dieta se basear apenas em alimentos terrestres, os seres humanos apresentam valores de $\delta^{15}N$ entre +5‰ a +12‰, tal como já foi referido anteriormente (Umbelino, 2006, München, 2007, Lee-Thorp, 2008, Keenleyside, *et al.*, 2009, Brown & Brown, 2011, Rand, 2011, Yoder, 2012).

A análise de isótopos estáveis de azoto pode também ser útil na investigação das práticas de amamentação e desmame utilizadas no passado. Estes estudos baseiam-se no facto de os tecidos das crianças que são amamentadas apresentarem valores de $\delta^{15}N$ superiores aos dos tecidos das suas mães em cerca de +3‰, ou seja, estas crianças estão um nível trófico acima das suas mães. Durante o processo de desmame, o consumo de alimentos suplementares resulta num declínio dos valores de $\delta^{15}N$. Quando o processo de desmame termina, os valores de $\delta^{15}N$ das crianças são praticamente iguais aos das suas mães, o que indica que ambos têm dietas semelhantes (Fuller, *et al.*, 2006, München, 2007, Keenleyside, *et al.*, 2009, Brown & Brown, 2011).

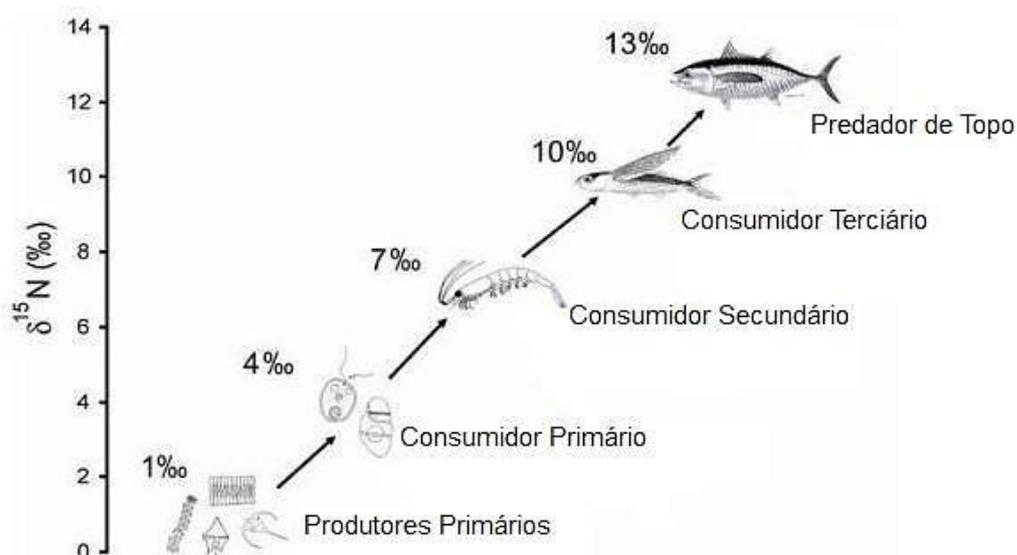


Figura 7 – Níveis tróficos da cadeia alimentar em ambientes marinhos (adaptado de <http://www.spc.int/oceanfish/en/ofpsection/ema/biological-research/74-trophic-dynamic/105-stomach-content-analyses>, consultado em 11/06/2014).

Contudo, uma das principais complicações associadas à reconstrução das dietas do passado é o facto de os valores de $\delta^{15}\text{N}$ dos tecidos animais poderem ser afetados por diversos fatores, tais como clima, precipitação anual e fertilização dos solos através da utilização de estrume animal. Os animais que vivem em ambientes com pouca precipitação (ambientes áridos) apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ superiores aos observados nos animais que vivem em regiões mais húmidas, sendo estes valores repercutidos ao longo da cadeia alimentar. As espécies adaptadas a climas secos possuem mecanismos capazes de reduzir o consumo de água, excretando mais ureia em relação ao volume total de urina, sendo eliminada uma maior quantidade de ^{14}N . Nestes ambientes áridos é possível que os animais consumam uma menor quantidade de proteína, podendo obter uma quantidade de proteína adicional a partir de bactérias simbióticas existentes no seu trato digestivo. Este processo levará a um fracionamento adicional dos isótopos de azoto e, em combinação com a excreção aumentada de ureia, conduzir a um enriquecimento de ^{15}N nos tecidos animais. Os tecidos animais apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados em cerca de 2 a +4‰, em relação aos animais dependentes de água. Outro dos fatores que pode afetar os valores de $\delta^{15}\text{N}$ é a fertilização dos terrenos de cultivo através da utilização de estrume animal, de modo a restaurar a quantidade de nutrientes e aumentar a produtividade das culturas. Os elevados valores de $\delta^{15}\text{N}$ no estrume animal resultam da perda de ^{14}N sob a forma de amónia gasosa, ficando uma quantidade residual de amónia enriquecida em ^{15}N . Esta amónia é subsequentemente convertida a nitrato, apresentando valores elevados de $\delta^{15}\text{N}$, sendo este absorvido pelas plantas. O nitrato absorvido vai ser utilizado pelas plantas na biossíntese de aminoácidos (Dupras, *et al.*, 2001, Umbelino, 2006, Bogaard, *et al.*, 2007, Thompson, *et al.*, 2008, Rand, 2011).

De forma a estabelecer uma correta interpretação dos resultados das dietas humanas do passado obtidos a partir da análise isotópica, é necessário um material de referência que seja geográfica e cronologicamente semelhante ao material humano recolhido do local em estudo. Assim, é de extrema importância analisar material faunístico, de forma a estabelecer uma linha de base do ecossistema em estudo, permitindo compreender se a fauna existente no local fazia parte da alimentação dos humanos (Müldner & Richards, 2007, Keenleyside, *et al.*, 2009, Fjellström, 2011, Rand, 2011, Stevens, *et al.*, 2012).

Em jeito de resumo, na figura 8 está representado um diagrama com os diferentes valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ referidos ao longo do texto, para as cadeias alimentares

terrestres e marinhas, de forma a tornar mais fácil a interpretação dos resultados das análises isotópicas.

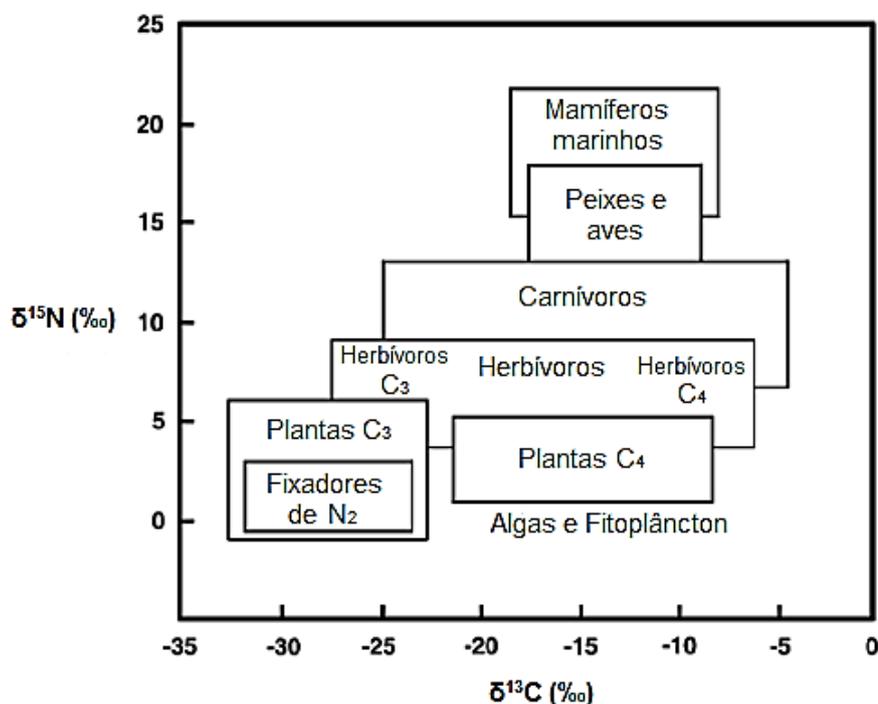


Figura 8 – Diagrama geral da composição isotópica por nível trófico nas cadeias alimentares terrestres e marinhas (adaptado de O'Connell, 1996).

1.1.4. Material Osteológico

Os restos osteológicos resultantes de escavações arqueológicas são o principal material biológico utilizado na determinação de dietas do passado, com base na análise isotópica. O osso é um tecido vivo que é constantemente remodelado durante a vida de um organismo e compreende três componentes principais: a componente inorgânica (70%), a matriz orgânica (25%) e água (5%). As células responsáveis pela síntese deste tecido são denominadas de osteoblastos enquanto os osteoclastos são responsáveis pela sua reabsorção. Há ainda um terceiro tipo de células, os osteócitos, que são osteoblastos que são incorporados no osso por eles formado e que contribuem para a remodelação do osso (figura 9). A componente inorgânica do osso é vulgarmente denominada de bioapatite e é maioritariamente constituída por fosfato de cálcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A matriz orgânica é formada em cerca de 90% por moléculas de colagénio, sendo os restantes 10% proteínas não colagénicas (tais como fosfoproteínas e glicoproteínas), glúcidos, lípidos, enzimas e hormonas. A nível macroscópico podem distinguir-se dois tipos de osso: o osso compacto

ou cortical e o osso esponjoso ou trabecular. O osso compacto ou cortical é formado por lâminas ósseas paralelas muito próximas entre si, constituindo uma substância dura e compacta que confere resistência ao osso. É constituinte dos ossos longos dos braços e das pernas, bem como das partes externas das costelas, pulsos e tornozelos. Já o osso esponjoso ou trabecular tem uma organização menos rígida que a do osso compacto ou cortical, sendo menos denso e apresentando um aspeto poroso a nível microscópico. Este tipo de osso pode ser encontrado nas partes centrais dos ossos longos, formando a medula óssea na qual as células sanguíneas são produzidas (O'Conner, 2000, Umbelino, 2006, Brown & Brown, 2011, Fjellström, 2011, Rand, 2011).

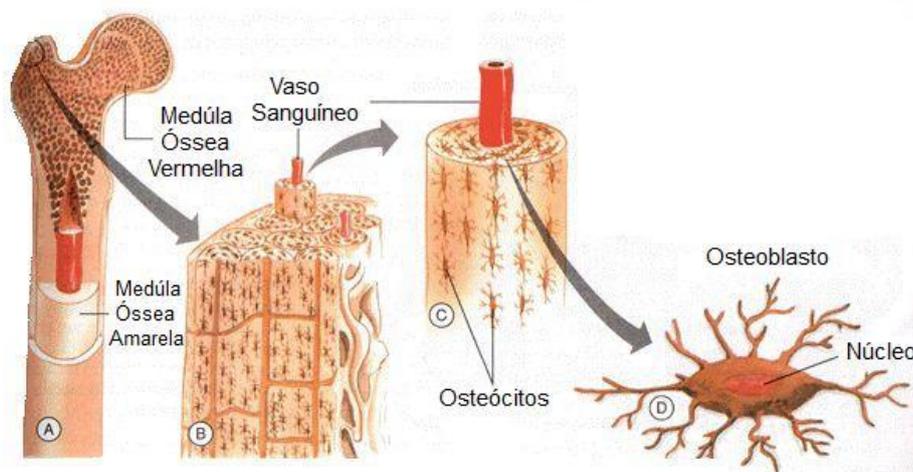


Figura 9 – Estrutura do tecido ósseo (adaptado de Amabis & Martho, 2004).

Como referido anteriormente, o colagénio é a proteína estrutural mais abundante da matriz orgânica do osso e é praticamente tudo o que resta de um esqueleto após um longo período de enterramento. É composto por três cadeias polipeptídicas que formam uma hélice tripla, agrupando-se em fibrilhas que, por sua vez, se agrupam em fibras de colagénio, contribuindo assim para a resistência mecânica do osso. O colagénio é essencialmente composto por três aminoácidos não essenciais, isto é, aqueles que podem ser sintetizados pelo organismo: a prolina, a glicina e a hidroxiprolina, que representam cerca de 78% dos átomos de carbono presentes nesta proteína. Os restantes 22% são aminoácidos essenciais, ou seja, aqueles que não podem ser sintetizados pelo próprio organismo e que por isso são obtidos através da alimentação. Como tal, pode assumir-se que o carbono presente no colagénio provém dos macronutrientes que compõem a dieta dos indivíduos, sendo assim possível determiná-la pela avaliação da composição isotópica do colagénio. Em relação ao azoto, também é possível determinar a sua composição isotópica através do colagénio, visto que as proteínas presentes na alimentação são a

fonte deste elemento. Assim, a análise isotópica do colagénio reflete a proteína consumida por um indivíduo durante os seus últimos 10 anos de vida, refletindo o processo de remodelação do tecido. A remodelação óssea realizada pelos osteoblastos e osteoclastos permite que a resistência mecânica do osso seja mantida e facilita a homeostase mineral, variando de acordo com a idade e com o tipo de osso. O estudo das dietas do passado é realizado principalmente a partir de colagénio de ossos longos, nomeadamente de fémures, visto que estes sofrem uma remodelação mais lenta e por isso contêm tecido formado ao longo da vida dos indivíduos. As análises em ossos que contêm uma maior quantidade de tecido esponjoso, como as costelas, representam a composição isotópica da dieta à altura da morte do indivíduo, pois neste tipo de ossos a remodelação do tecido é muito mais rápida (Fuller, *et al.*, 2006, Umbelino, 2006, München, 2007, Quintas, *et al.*, 2008, Rand, 2011, Yoder, 2012, Budd, *et al.*, 2013).

Após o enterramento, os ossos podem sofrer alterações químicas estruturais devido sobretudo a condições de humidade não apropriadas, mudanças de pH e de temperatura e ataques microbiológicos ao longo do tempo, podendo estas alterações degradar o colagénio e afetar a sua composição elementar e isotópica, embora por vezes apenas torne a sua extração mais difícil. A este conjunto de alterações dá-se o nome de diagénese. Ao longo do tempo foram desenvolvidas diversas técnicas que permitem avaliar o grau de preservação e contaminação do colagénio, entre as quais se destacam a determinação do rendimento da extração de colagénio, a razão entre o carbono e o azoto (razão C:N) e a composição em peso por cento (do inglês *weight percent* – wt.%) de carbono e azoto, numa amostra óssea, determinadas por análise elementar (recorrendo a um analisador elementar acoplado ao IRMS – EA-IRMS, do inglês *Elemental Analysis – Isotope Ratio Mass Spectrometry*). O rendimento da extração de colagénio é calculado dividindo a massa de colagénio obtida pela massa de amostra de osso utilizada inicialmente e multiplicando por 100%:

$$\text{Rendimento do colagénio (\%)} = \frac{\text{massa de colagénio}}{\text{massa de osso}} \times 100$$

Considera-se que o colagénio está diageneticamente alterado quando o rendimento da extração está abaixo de 1%. O colagénio pode considerar-se como estando bem preservado e sem sinais de contaminação quando apresenta uma razão C:N entre 2,9 e 3,6. Em relação à composição de carbono e de azoto do colagénio, considera-se que este está bem preservado quando possui uma percentagem de carbono acima de 13% e uma

percentagem de azoto acima de 4,8% (DeNiro, 1985, Van Klinken, 1999, München, 2007, Lee-Thorp, 2008, Fjellström, 2011, Rand, 2011, Salesse, *et al.*, 2013).

1.2. Metodologia Analítica: Extração e Análise

Muitos são os métodos descritos para a extração de colagénio, tendo a grande maioria sido modificada ao longo dos tempos. O método mais simples e antigo para extrair o colagénio ósseo envolve a dissolução da componente inorgânica, vulgarmente designada por bioapatite, em meio ácido. As amostras de ossos são fragmentadas em pequenos pedaços e desmineralizadas com um ácido mineral dissolvido, geralmente o ácido clorídrico (HCl). Em alguns protocolos, esta desmineralização é seguida pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) para a remoção de ácidos húmicos, que são os principais componentes das substâncias húmicas (constituintes orgânicos e partículas minerais do solo provenientes de restos animais e vegetais), e que podem contaminar o osso enquanto este está enterrado. Em ossos bem preservados, a desmineralização dos pedaços de osso dá origem a um pseudomorfo, isto é, um pedaço de colagénio com o mesmo tamanho e forma que o osso original mas com aspeto translúcido e flexível devido à perda da componente inorgânica. Os ossos que aparentam uma má preservação não originam um pseudomorfo após a desmineralização, podendo dissolver-se por completo no ácido ou podendo formar pequenos tufos de material gelatinoso que irão flutuar na solução. Quando tal se verifica significa que os ossos podem estar diageneticamente alterados. Quando há formação de pseudomorfo, segue-se um passo de gelatinização que consiste em solubilizar (desnaturar) o colagénio em ácido diluído aquecido, com subsequente filtração e liofilização. A liofilização envolve a remoção de água ou outro solvente, a partir de um produto congelado, através de um processo denominado de sublimação. A sublimação ocorre quando o líquido congelado passa diretamente para o estado gasoso sem passar pela fase líquida, possibilitando a obtenção de um produto estável fácil de utilizar e com um bom aspeto visual. Alguns autores introduziram alterações ao método descrito anteriormente, tais como a realização de ultrafiltração que permite purificar o colagénio solubilizado e a remoção de lípidos através da utilização de uma mistura de clorofórmio e metanol (Liden, *et al.*, 1995, Labconco, 2004, Jorkov, *et al.*, 2007, Rand, 2011, Sealy, *et al.*, 2014).

Os isótopos estáveis de carbono e de azoto presentes em materiais como o colagénio são quantificados através de um espectrómetro de massa de razões isotópicas. Como referido anteriormente no ponto 1.1.1., a razão entre estes isótopos é sempre

medida relativamente a padrões internacionais. Um IRMS compreende cinco secções principais: um sistema de introdução da amostra, uma fonte de ionização de eletrões, um analisador magnético, uma série de detetores de Faraday e um sistema de aquisição de dados controlado por um computador. Podem ser utilizadas diferentes interfaces para introduzir as amostras no IRMS, sendo as mais comuns os analisadores elementares (EA-IRMS) e os cromatógrafos de fase gasosa (GC-IRMS). Em estudos de dietas do passado são utilizados os EA-IRMS para analisar as amostras de colagénio ósseo, visto que nesta técnica podem ser utilizadas amostras líquidas não-voláteis ou sólidas, como é o caso. Nesta técnica, a medição da razão isotópica das amostras é realizada mediante a pesagem e a introdução da amostra em cápsulas de prata ou de estanho, sendo posteriormente colocadas num carrossel (amostrador automático) que caem dentro do forno de combustão quando o carrossel é acionado. A amostra sofre então combustão a elevadas temperaturas sob um fluxo de oxigénio. Os produtos da combustão são arrastados por uma corrente de hélio a um forno de redução onde os óxidos de azoto (NOx) são convertidos em N₂ e o excesso de oxigénio é removido. Os gases resultantes (CO₂, N₂ e H₂O) passam em seguida por uma armadilha química para remoção da água produzida a partir da combustão. Posteriormente, o CO₂ e o N₂ são separados através de uma coluna cromatográfica. Após a entrada no IRMS as partículas são ionizadas e carregadas positivamente. Os iões monopositivos dos diferentes isótopos são desviados com intensidades diferentes por um campo magnético, de modo a que cada um possa ser direcionado para o detetor de Faraday correspondente, que capta os iões, gerando uma corrente elétrica que é medida a fim de quantificar cada isótopo presente na amostra inicial (figura 10) (Janeiro, 2008, Muccio & Jackson, 2009, Brown & Brown, 2011, Fjellström, 2011).

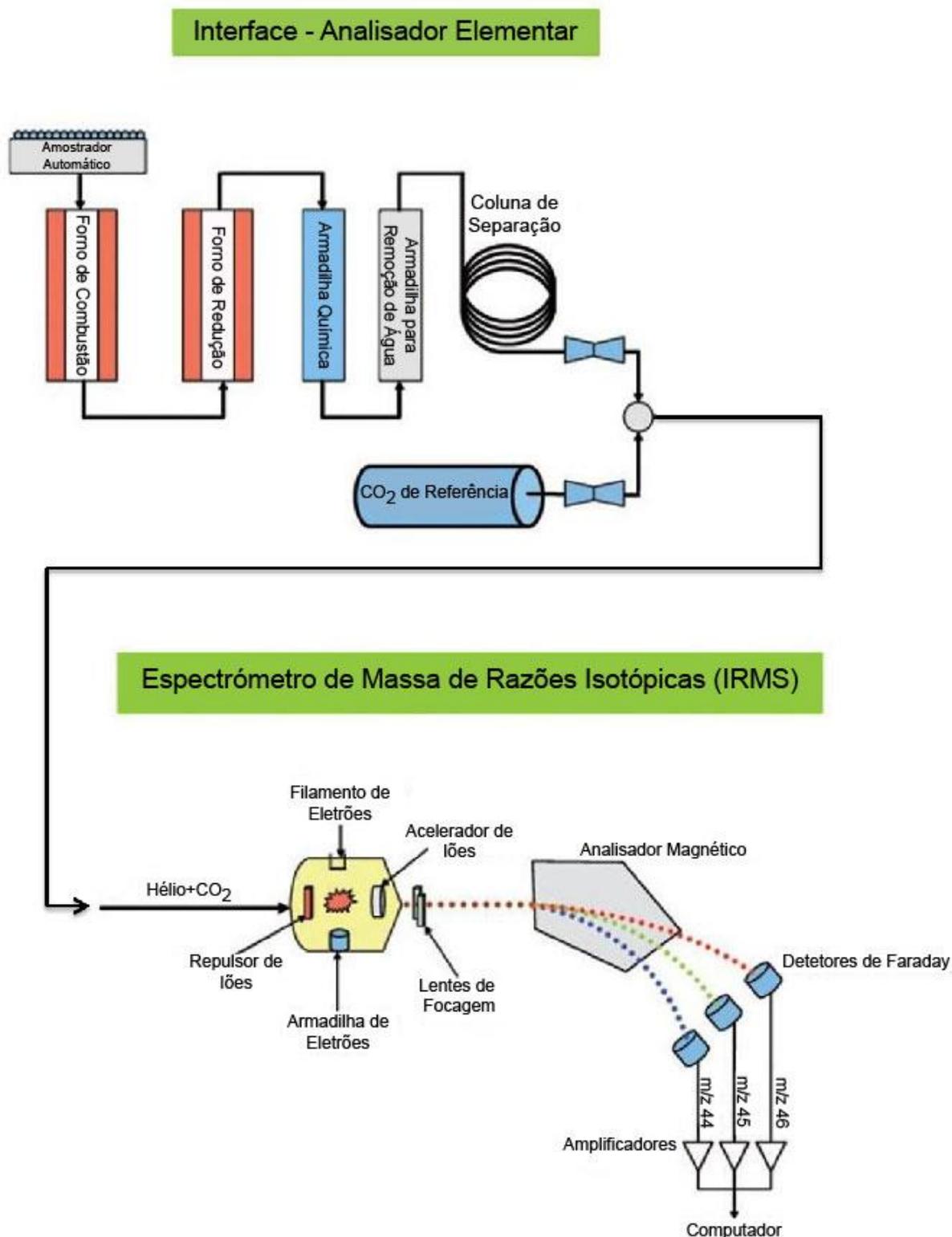


Figura 10 – Esquema representativo do funcionamento de um EA-IRMS para a medição de isótopos de carbono (adaptado de Muccio & Jackson, 2009).

1.3. Contextualização Arqueológica

Neste estudo utilizou-se material osteológico arqueológico recolhido nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate, situadas na região de Pax Julia (Beja).

A *villa* romana do Monte da Cegonha situa-se na freguesia de Selmes, concelho de Vidigueira, a cerca de 13 Km de Beja (figura 11). A *villa* romana do Monte da Cegonha, que foi escavada entre 1987 e 1991, está implantada no sopé de uma encosta suave, junto a uma pequena linha de água de regime irregular que mais adiante se vai unir à Ribeira de S. Pedro e esta à de Odearce. O solo é caracterizado pelas suas especiais aptidões agrícolas e pecuárias. Esta *villa* terá sido construída por volta do século I d.C. e foi ocupada até ao século XII (figura 12). No final do século IV o edifício foi alvo de uma grande reconstrução, tendo sido aproveitadas as estruturas pré-existentes para a construção de um novo espaço de habitação assim como para uma basílica paleocristã (que marca o início do cristianismo). O corpo da basílica e o espaço a leste e oeste foram ocupados por uma necrópole de inumação (local destinado à sepultura dos mortos) ainda no século IV. As sepulturas escavadas eram todas constituídas por uma caixa construída com materiais reutilizados, pedra, tijolo e telhas (telha) e revestidas por *opus signinum* (material de construção utilizado na Roma antiga, feito de telhas partidas aos bocados e misturadas com uma argamassa), com exceção de duas sepulturas de crianças. Todas as sepulturas foram utilizadas e reutilizadas várias vezes visto que aos pés de cada sepultura se encontravam ossários (depósito onde se guardam ossos) acumulados. A partir de uma análise estratigráfica (estudo das camadas do solo) foi possível confirmar que anteriormente a estas remodelações (século IV) não houve enterramentos na basílica visto que os níveis abaixo do pavimento foram perfurados para introdução das sepulturas. Numa segunda fase, que se deve ter prolongado até finais do século VI, a basílica foi utilizada como necrópole até à proibição dos enterramentos no interior dos templos (em 572), o que terá levado ao lançamento de um novo pavimento. Sob este pavimento ficaram todas as sepulturas encontradas nas escavações. Assim, os ossos humanos estudados neste trabalho serão ossos de indivíduos que viveram entre os finais do século IV e os finais do século VI, podendo ser tardo-antigos (Alfenim & Lopes, 1992, Wolfram, 2011).

A *villa* romana de São Cucufate situa-se na freguesia de Vila de Frades, concelho de Vidigueira, a cerca de 24 Km de Beja (figura 11), tendo sido classificada como monumento nacional em 1947. As escavações nesta *villa* tiveram lugar entre 1979 e 1984, sob a responsabilidade da Missão Arqueológica Francesa em Portugal e do Instituto de Arqueologia da Universidade de Coimbra. Esta *villa* encontra-se num local pouco elevado,

tendo sido construída no século I d.C., como centro de uma exploração agrícola que integrava a residência do proprietário, habitações para os seus criados e escravos, armazéns, celeiros, adegas e lagares. Até ao século IV, a “casa” construída no século I sofreu duas grandes remodelações: a primeira no século II e a segunda em meados do século IV. É no século IV que a *villa* atinge o seu auge com a construção de um templo a sul da *villa*, cujas ruínas podem ser visitadas atualmente (figura 13). Na primeira metade do século V, começaram a ser instalados túmulos no terreno em redor do templo (períbolo), o que revela uma cristianização dos proprietários. Antes do final do século V a *villa* foi abandonada, sendo ocupada no século IX com a construção de um mosteiro, reutilizando grande parte das ruínas romanas existentes. Durante as escavações realizadas, foram descobertas 15 sepulturas construídas em caixas feitas de tijolos e telhas, à exceção de quatro que eram simples covas na terra, na zona do períbolo. Estas sepulturas encontravam-se sob o novo pavimento construído no século IX, o que pressupõe que os ossos humanos utilizados no presente estudo serão ossos de indivíduos que viveram entre a primeira metade e o final do século V, ou seja, são tardo-antigos (Alarcão, *et al.*, 1990, Smadja, 1992, IGESPAR, 2011, Wolfram, 2011).

A informação sobre o que seria a dieta dos romanos encontra-se dispersa em textos de vários autores. A grande maioria afirma que a dieta romana era baseada sobretudo em cereais, azeite e vinho, estando também incluídos os legumes, tais como favas, lentilhas, grão-de-bico e ervilhas. O trigo e a cevada seriam as fontes primárias de proteína. A carne e outros produtos de origem animal eram consumidos em menor quantidade, sendo a carne de porco a mais consumida, seguindo-se a carne de ovelha e de cabra, embora estes animais fossem criados principalmente para obter lã e leite. A carne de bovino representava uma pequena componente da dieta visto que o gado bovino era utilizado sobretudo como animal de tração. O peixe era considerado um alimento dispendioso, o que sugere que o seu consumo regular era restrito a membros da elite da sociedade. O peixe era também consumido sob a forma de molhos de peixe (*garum*). A quantidade e a qualidade dos alimentos ingeridos dependiam da região e do tipo de classe social. Aqueles que não pertenciam à elite da sociedade tinham acesso limitado a alimentos considerados dispendiosos, tais como o peixe, a carne, o vinho e o azeite, bem como o trigo e a cevada. Os indivíduos que provinham de uma classe social mais baixa consumiam milho painço (característico das regiões áridas) como alternativa ao trigo (Prowse, *et al.*, 2004, Prowse, *et al.*, 2005, Müldner & Richards, 2007, Keenleyside, *et al.*, 2009, Killgrove & Tykot, 2013).

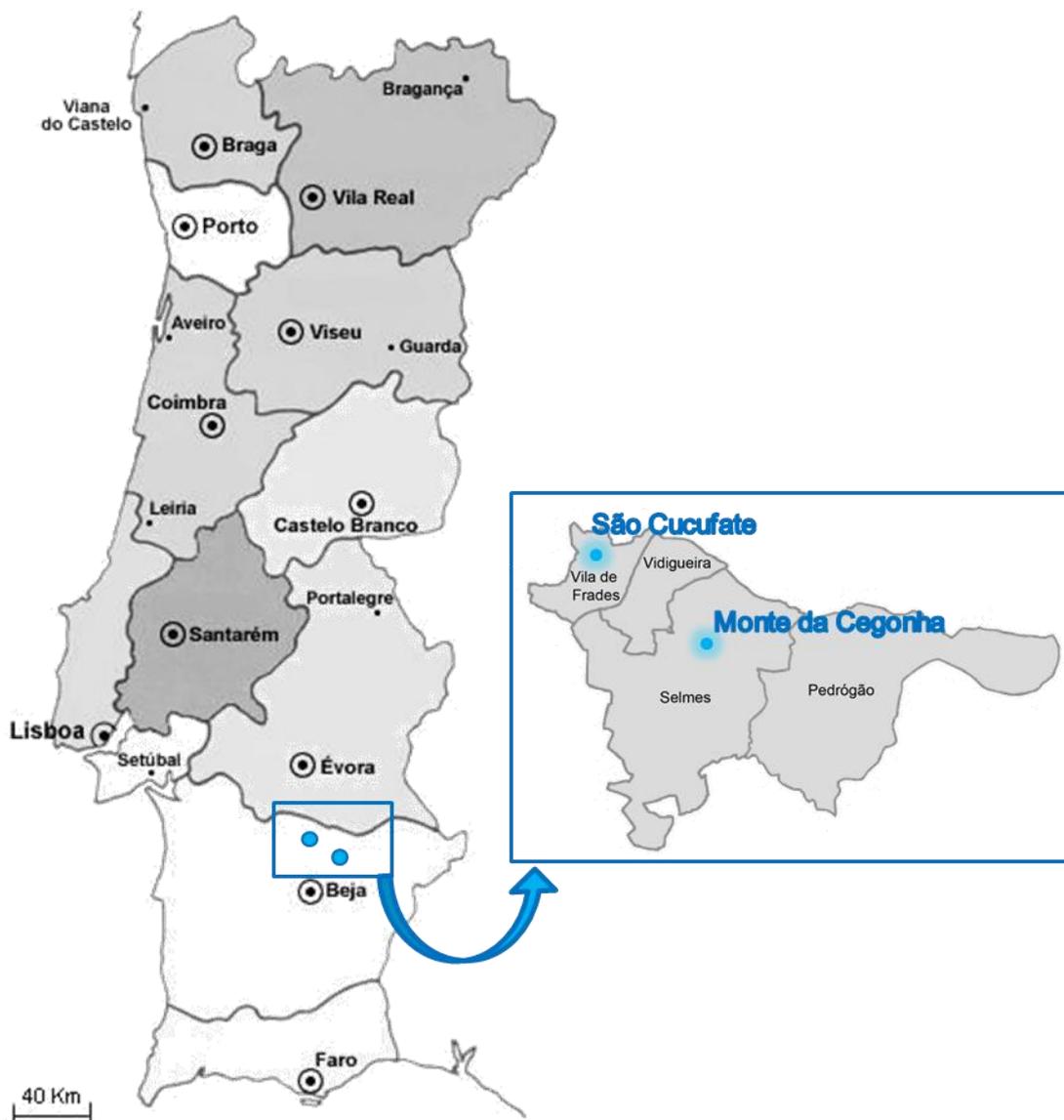


Figura 11 – Localização das *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate (adaptado de <http://www.rhizobia.uevora.pt/straincollection.html>, consultado em 09/09/2014 e de http://www.viladefrades.pt/portal/v3.0/mod_texto.asp?pag=34335267622766558199701219, consultado em 09/09/2014).



Figura 12 – Vista aérea da *villa* romana do Monte da Cegonha (imagem gentilmente cedida por Rafael Alfenim).



Figura 13 – Vista geral e parcial das ruínas de São Cucufate (adaptado de <http://www.igespar.pt/pt/patrimonio/pesquisa/geral/patrimonioimovel/detail/70270/>, consultado em 11-06-2014).

2. Problemática e Objetivos

2.1. Problemática

“Cada um é aquilo que come”. A alimentação é uma componente fundamental de qualquer cultura, não só como meio de subsistência e de manutenção do metabolismo basal, mas também como meio de estabelecimento e manutenção da identidade social, não refletindo apenas as nossas escolhas pessoais mas sim um conjunto de influências, tais como condição social ou de classe, crenças religiosas, género ou grupo étnico, acessibilidade, práticas rituais ou tradições.

Através do estudo das paleodietas é possível caracterizar os alimentos ingeridos por um indivíduo no passado e obter informações relativas ao padrão de subsistência de uma população, ao acesso a recursos alimentares, às diferenças entre os géneros, à hierarquia social e às semelhanças e diferenças entre diferentes populações. A análise das dietas do passado é baseada na comparação entre as composições isotópicas do colagénio ósseo, que é constituído por aminoácidos que são sintetizados diretamente a partir da dieta.

No presente trabalho pretendeu-se obter informação sobre a dieta romana durante o período Tardo-Antigo da região de Pax Julia (Beja), a partir da análise isotópica de material osteológico arqueológico recolhido nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate (distrito de Beja), visto que a informação sobre o que seria a dieta dos romanos se encontra dispersa em textos de diferentes autores e períodos históricos.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto HEROICA: Saúde e Alimentação na Ibéria Romana – Um Case-Study em Arqueometria (PTDC/HIS-ARQ/120236/2010), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

2.2. Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho consiste na obtenção de informação sobre a dieta romana durante o período Tardo-Antigo da região de Pax Julia (Beja), através da análise isotópica de material osteológico arqueológico recolhido na região.

2.3. Objetivos Específicos

Mais especificamente pretendeu-se:

- Estabelecer metodologias analíticas para a extração de colagénio a partir de material osteológico arqueológico;
- Otimizar o processo analítico de extração de colagénio para posterior determinação das razões isotópicas de carbono e azoto;
- Estabelecer metodologias para obtenção dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nas amostras de colagénio;
- Compreender a importância do fracionamento isotópico de carbono e azoto e a sua relação com a identificação da dieta do indivíduo;
- Entender a necessidade de realização de análises isotópicas de restos osteológicos arqueológicos faunísticos;
- Perceber a influência da diagénese na preservação do colagénio e na qualidade dos resultados das análises isotópicas.

3. Metodologia

3.1. Estratégia

Local de realização: Laboratório HERCULES, Universidade de Évora, Portugal.

Apoio financeiro: projeto HEROICA: Saúde e Alimentação na Ibéria Romana – Um Case-Study em Arqueometria (PTDC/HIS-ARQ/120236/2010), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e Projeto LARES (Operação nr. ALENT-07-0224-FEDER-001761, INALENTEJO/QREN/FEDER).

Duração: 1 ano letivo.

Amostras: restos osteológicos arqueológicos humanos e faunísticos recolhidos nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate (Beja).

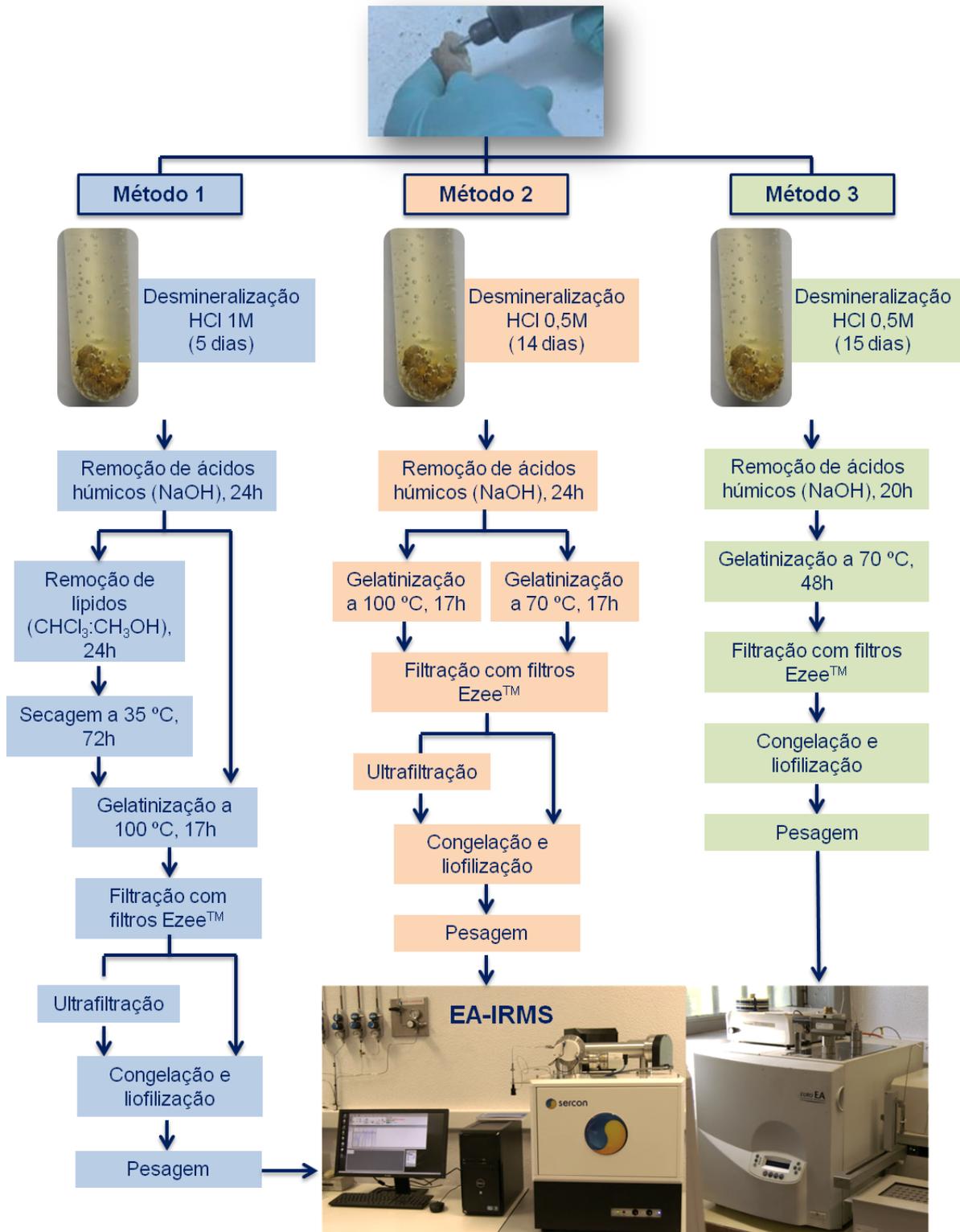
Técnicas utilizadas:

- Extração de colagénio;
- Ultrafiltração;
- Espectrometria de massa de razões isotópicas acoplada a um analisador elementar (EA-IRMS).

Análise estatística dos resultados:

Os resultados da análise isotópica dos diferentes métodos de otimização de extração de colagénio, bem como dos restos osteológicos arqueológicos humanos e faunísticos das *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate, foram validados estatisticamente utilizando o programa SPSS para Windows, versão 19, Copyright[®] Microsoft Corporation. Foi realizada a comparação múltipla das médias dos resultados da otimização da extração do colagénio recorrendo ao teste de Tukey para um nível de significância de 5%. As diferenças nos resultados dos restos osteológicos arqueológicos das duas *villae* romanas foram realizadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney para um nível de significância de 5%.

3.2. Diagrama do Trabalho



3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Amostras Arqueológicas das Villae Romanas no Monte da Cegonha e de São Cucufate

A partir dos restos osteológicos humanos do Monte da Cegonha obtiveram-se 25 amostras, das quais 5 pertencem a indivíduos não-adultos, 6 a jovens adultos, 10 a adultos e 1 de idade indeterminada (tabela 3). Estes indivíduos foram também distinguidos pelo sexo, podendo ser do sexo feminino ou masculino (anexo I). Em relação aos restos osteológicos faunísticos do Monte da Cegonha obtiveram-se 21 amostras, das quais fazem parte porcos (*Sus sp.*), bovinos (*Bos taurus*), cabras (*Capra hircus*), ovelhas ou cabras (*Capra hircus/Ovis aries*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e veados (*Cervus elaphus*) (tabela 3), que foram também distinguidos pela sua idade, podendo ser não-adultos ou adultos (anexo I). Dos restos osteológicos humanos de São Cucufate obtiveram-se 13 amostras, das quais 3 pertencem a indivíduos não-adultos e 10 a adultos (tabela 3), podendo-se também distingui-los pelo sexo, tal como nos indivíduos do Monte da Cegonha (anexo I). Em relação aos restos faunísticos de São Cucufate obtiveram-se 19 amostras, das quais fazem parte porcos, cães (*Canis familiaris*), cabras, ovelhas ou cabras e veados (tabela 3), que foram também distinguidos pela sua idade, tal como na fauna do Monte da Cegonha (anexo I). As análises antropológicas (determinação do sexo, idade e patologias) dos restos osteológicos humanos provenientes das duas villae romanas foram realizadas no Centro de Investigação em Antropologia e Saúde da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (anexo I), enquanto os restos osteológicos faunísticos das duas villae romanas foram estudados no Laboratório HERCULES pela Professora Doutora Maria João Valente da Universidade do Algarve (anexo I).

Tabela 3 – Amostras de restos osteológicos humanos e faunísticos recolhidos nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate. No anexo I encontra-se informação antropológica mais detalhada sobre os restos osteológicos humanos e faunísticos das duas *villae* romanas.

Amostras	Monte da Cegonha	São Cucufate
Restos osteológicos humanos	5 Indivíduos não-adultos	
	6 Indivíduos jovens adultos	3 Indivíduos não-adultos
	10 Indivíduos adultos	10 Indivíduos adultos
	1 Indivíduo de idade indeterminada	
Restos osteológicos faunísticos	1 Porco	1 Porco
	7 Bovinos	5 Cães
	6 Cabras	7 Cabras
	5 Ovelhas ou Cabras	4 Ovelhas ou Cabras
	1 Coelho	2 Veados
	1 Veado	

3.3.2. Métodos de Otimização da Extração de Colagénio

Devido à grande variedade de métodos descritos na literatura para a extração de colagénio em amostras de material osteológico arqueológico, procedeu-se à otimização da extração de colagénio com vista à determinação do procedimento que conduza a uma maior produtividade (maior quantidade de colagénio em bom estado de preservação). Os principais pontos de interesse prendem-se com a avaliação da necessidade de realização de ultrafiltração e de extração de lípidos. Assim, conjugaram-se procedimentos de diferentes autores de modo a obter três métodos de extração diferentes. Para os três diferentes métodos (métodos 1, 2 e 3) utilizou-se o mesmo material osteológico arqueológico, de modo a facilitar a comparação de resultados. O material osteológico arqueológico em causa é um rádio direito de bovino (FMC 5) (anexo I) do qual existia grande quantidade de amostra. Começou-se por retirar cerca de 1 g de osso para cada método e limpou-se a superfície deste com uma ferramenta multifunções Skil® 125 Watt, de modo a remover os contaminantes aderentes (Jorkov, *et al.*, 2007, Knudson, *et al.*, 2007, Jorkov, *et al.*, 2010). Em seguida partiu-se cada um dos pedaços de osso em pedaços mais pequenos, de forma a obter amostras com 200 a 500 mg (Knipper, *et al.*, 2013). Transferiram-se os pedaços de osso para tubos de ensaio de polipropileno (Elkay Laboratory Products), anotando a massa final da amostra. Por fim separaram-se as amostras para testar os três métodos:

I. Método 1

Na figura 14 está representado um diagrama que resume o método 1. Começou-se por desmineralizar as amostras (amostras A a L) adicionando 10 mL de HCl 1M. Taparam-

se as amostras com película vedante (Parafilm® M) com pequenos furos, para libertação do CO₂ (Ambrose, 1990, Jorkov, *et al.*, 2007, München, 2007, Salesse, *et al.*, 2013). Após cinco dias, centrifugaram-se as amostras a 5000 rpm durante 10 minutos e retirou-se o HCl. Em seguida lavaram-se as amostras com água Milli-Q, centrifugando com as condições referidas anteriormente, repetindo o processo três a cinco vezes até pH=7 (Jorkov, *et al.*, 2007, Fjellström, 2011, Müldner, *et al.*, 2011, Knipper, *et al.*, 2013). Após a remoção da água Milli-Q, adicionaram-se 10 mL de NaOH 0,125M às amostras, ficando estas 24h à temperatura ambiente (Ambrose, 1990, Bocherens, *et al.*, 1991, Jorkov, *et al.*, 2007, München, 2007, Salesse, *et al.*, 2013). Após as 24h centrifugaram-se as amostras a 5000 rpm durante 10 minutos. Lavaram-se as amostras com água Milli-Q, repetindo o processo acima descrito (Jorkov, *et al.*, 2007).

Após a remoção da água Milli-Q, adicionaram-se 10 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1) para remoção de lípidos às amostras B, D, G, H, J e L (método 1 a)) (Liden, *et al.*, 1995, Tykot, 2004). Colocaram-se as amostras no banho de ultrassons durante 15 minutos, repetindo-se o processo duas vezes durante 24h. Após as 24h retirou-se a mistura e colocaram-se as amostras na estufa durante 72h a 35 °C para eliminar por completo a mistura de solventes. Posteriormente procedeu-se à gelatinização de todas as amostras, incluindo as amostras A, C, E, F, I e K (método 1 b)) às quais não se adicionou a mistura de clorofórmio:metanol, adicionando-se 10 mL de HCl 0,01M e colocando na estufa durante 17h a 100 °C (Bocherens, *et al.*, 1991, Salesse, *et al.*, 2013). Taparam-se as amostras com as tampas com pequenos furos para estas não saltarem dentro da estufa. Após a gelatinização filtraram-se as amostras com filtros Ezee™ (Elkay Laboratory Products), transferindo o filtrado para novos tubos de ensaio previamente tarados e anotando o peso (Jorkov, *et al.*, 2007, Britton, *et al.*, 2008, Jorkov, *et al.*, 2010, Müldner, *et al.*, 2011, Knipper, *et al.*, 2013). Colocaram-se as amostras A, B, D, E, I e J no congelador, tapadas com película vedante com pequenos furos. De seguida ultrafiltraram-se as amostras C, F e K (método 1 c)) e G, H e L (método 1 d)), com filtros Amicon® Ultra-4 Centrifugal (Millipore) (Brown, *et al.*, 1988, Jorkov, *et al.*, 2007, Jorkov, *et al.*, 2010, Fjellström, 2011, Knipper, *et al.*, 2013, Sealy, *et al.*, 2014). Previamente à utilização destes filtros, estes foram imersos em água Milli-Q *overnight* e centrifugados com água Milli-Q, NaOH 0,125M e três vezes com água Milli-Q, durante 10 minutos a 2800 rpm, de forma a eliminar possíveis contaminações com carbono durante o seu fabrico (Knipper, *et al.*, 2013, Sealy, *et al.*, 2014). Colocaram-se as amostras no congelador, tapadas com película vedante com pequenos furos. Por fim, liofilizaram-se todas as amostras durante 48h e

pesaram-se (Brown, *et al.*, 1988, Jorkov, *et al.*, 2007, Britton, *et al.*, 2008, Knipper, *et al.*, 2013).

II. Método 2

Na figura 14 está representado um diagrama que resume o método 2. Para a execução deste método procedeu-se de modo semelhante ao método 1. Procedeu-se à desmineralização das amostras (amostras M a R) substituindo o HCl 1M por HCl 0,5M e deixando todas as amostras no frigorífico (Britton, *et al.*, 2008, Müldner, *et al.*, 2011). Ao contrário do método 1, a desmineralização deste método decorreu durante 14 dias, após os quais se retirou o HCl, lavaram-se as amostras, adicionou-se NaOH e lavaram-se novamente as amostras tal como descrito no método 1. Ao contrário do método anterior, não se adiciona a mistura de clorofórmio:metanol para remoção de lípidos. No processo de gelatinização adicionaram-se 5 mL de HCl 0,01M às amostras M, N e O (método 2 a)), colocando-as na estufa durante 17h a 100 °C (Bocherens, *et al.*, 1991, Salesse, *et al.*, 2013), tendo-se adicionado 5 mL de HCl 0,01M às amostras P, Q e R (método 2 b)) colocando-as na estufa durante 17h a 70 °C, mantendo-as tapadas com as tampas com pequenos furos para estas não saltarem dentro da estufa. Após a gelatinização filtraram-se as amostras com filtros Ezee™, tal como no primeiro método. Colocaram-se as amostras M, N, P e Q no congelador, tapadas com película vedante com pequenos furos. Por fim, ultrafiltraram-se as amostras O (método 2 c)) e R (método 2 d)), colocaram-se as amostras no congelador, liofilizaram-se e pesaram-se, tal como no método 1.

III. Método 3

Tal como nos métodos descritos anteriormente, na figura 14 está representado um diagrama que resume o método 3. Neste método procedeu-se de modo semelhante ao método 2. Procedeu-se à desmineralização das amostras (amostras S a V) adicionando-se 10 mL de HCl 0,5 M e deixando as amostras no frigorífico. Durante a desmineralização verificou-se diariamente o pH das amostras, agitando-se as mesmas em *Vortex* duas vezes por dia e mudando o ácido sempre que se verificaram alterações do pH (Umbelino, 2002, Britton, *et al.*, 2008, Turner, *et al.*, 2012). Ao contrário do método 2, a desmineralização deste método decorreu durante 15 dias, após os quais se retirou o HCl e se lavaram as amostras, tal como nos outros métodos. Após a remoção da água Milli-Q, adicionaram-se 10 mL de NaOH 0,125M às amostras, ficando estas 20h à temperatura

ambiente (Bocherens, *et al.*, 1991) e lavaram-se novamente as amostras, tal como descritos nos métodos 1 e 2. Seguiu-se o processo de gelatinização onde se adicionaram 5 mL de HCl 0,01M às amostras, colocando-as na estufa durante 48h a 70 °C e tapando-as com as tampas com pequenos furos para estas não saltarem dentro da estufa (Umbelino, 2002, Britton, *et al.*, 2008, Thompson, *et al.*, 2008, Müldner, *et al.*, 2011, Knipper, *et al.*, 2013). Após a gelatinização filtraram-se as amostras com filtros Ezee™, colocaram-se as amostras no congelador, liofilizaram-se e pesaram-se tal como no método 2.

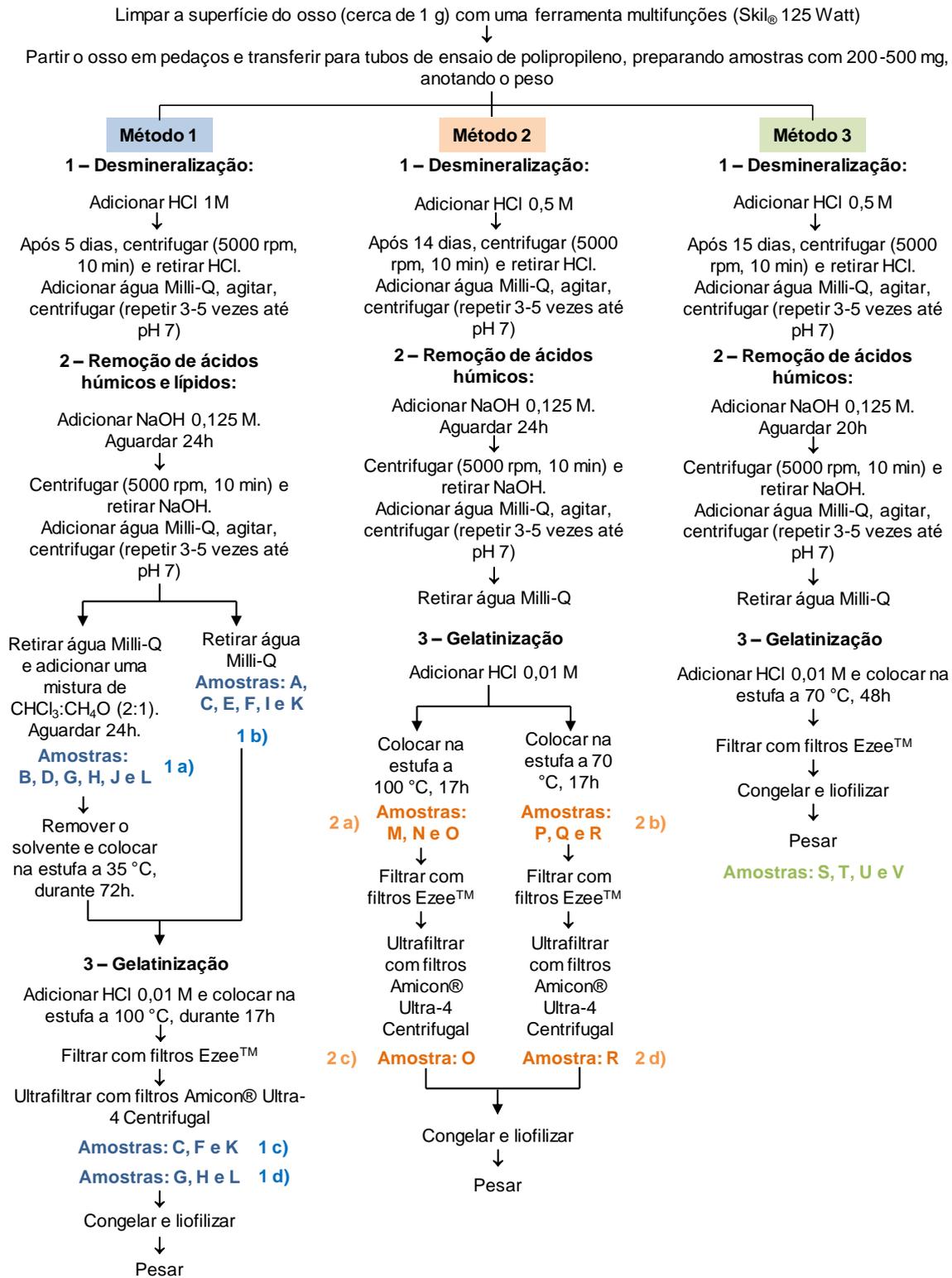


Figura 14 – Diagrama representativo dos métodos 1, 2 e 3 utilizados na otimização da extração de colagénio.

3.3.3. Extração de Colagénio das Amostras do Monte da Cegonha e de São Cucufate

Após a análise dos resultados obtidos a partir da otimização do procedimento de extração, que serão apresentados e discutidos no ponto 4, optou-se por selecionar o método 3. Procedeu-se então à extração de colagénio dos restos osteológicos humanos e faunísticos do Monte da Cegonha e de São Cucufate, utilizando o método 3 com pequenas alterações. Após a limpeza da superfície dos ossos, estes foram partidos em pedaços mais pequenos, de forma a obter amostras com 400 a 700 mg. Depois do início da desmineralização taparam-se as amostras com as tampas dos respetivos tubos, nas quais foram feitos pequenos furos para libertação do CO₂, e deixaram-se as amostras no frigorífico. Após 21 dias, centrifugaram-se as amostras a 5000 rpm durante 10 minutos e retirou-se o HCl. É importante referir que a desmineralização de todas as amostras de São Cucufate decorreu durante 21 dias, enquanto nas amostras do Monte da Cegonha o processo de desmineralização decorreu entre 28 a 36 dias. Filtraram-se as amostras com filtros Ezee™, transferindo o filtrado para *vials* de polipropileno de 20 mL (Sigma-Aldrich) previamente tarados e anotando o peso. Congelaram-se as amostras com azoto líquido, liofilizaram-se durante 48h, pesaram-se e guardaram-se num exsiccador.

3.3.4. Análise Isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ por EA-IRMS

A análise dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ das amostras utilizadas no estudo de otimização do método de extração do colagénio, métodos 1, 2 e 3, foram determinadas por espectrometria de massa de razão de isótopos estáveis em modo de fluxo contínuo (CF-IRMS) realizada na Unidade de Recursos Analíticos e de Isótopos Estáveis (do inglês *Stable Isotopes and Instrumental Analysis Facility* – SIIAF) do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, tendo sido utilizado um espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Sercon Hydra 20-22 acoplado a um Analisador Elementar EuroEA, que efetua a preparação automática das amostras por combustão de Dumas. Foram utilizados os materiais de referência *Protein Standard OAS*, *Sorghum Flour Standard OAS* e IAEA-N1 nas determinações da razão isotópica de azoto e de carbono; os valores de $\delta^{13}\text{C}$ apresentam-se na escala determinada pelo PDB, enquanto os valores de $\delta^{15}\text{N}$ se reportam ao Ar atmosférico. A precisão das análises, calculada a partir da análise de 6 a 9 réplicas de padrões de laboratório, intercaladas em cada conjunto de análises, foi igual ou inferior a 0.2‰.

Para a realização destas análises pesou-se cerca de 1 mg de cada uma das amostras de colagénio extraído.



Figura 15 – Espectrómetro de massa de razões isotópicas Sercon acoplado a analisador elementar EuroVector da Unidade de Recursos Analíticos e de Isótopos Estáveis (SIAF) do Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

As amostras dos restos osteológicos das *villae* romanas foram analisadas no Laboratório de Espectrometria de Massa do Laboratório HERCULES, tendo sido utilizado um espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Thermo Scientific, modelo Delta V Advantage acoplado a um analisador elementar da marca Thermo Scientific, modelo Flash 2000 (figura 16). Na determinação da composição elementar do carbono (%) e do azoto (%) nas amostras através da técnica de análise elementar, utilizaram-se padrões em todas as sequências de análise, tais como a acetanilida, a sulfanilamida, o ácido aspártico e a nicotinamida, bem como a cafeína e a l-alanina. A utilização destes padrões deve-se à necessidade de determinação da precisão do analisador elementar. Ao longo da sequência de análise foram utilizados os mesmos padrões, que foram calibrados contra materiais de intercomparação, tais como o sulfato de amónio (IAEA-N-1 e IAEA-N-2) (para o azoto), a cafeína (IAEA-600) (para o carbono e o azoto), a sacarose (IAEA-CH-6) (para o carbono) e o polietileno (IAEA-CH-7) (para o carbono), de forma a verificar a sua composição isotópica. Estes materiais de intercomparação foram posteriormente utilizados para verificar o desvio dos valores isotópicos ao longo da sequência, ou seja, foram utilizados para proceder à normalização dos valores isotópicos. Para estas análises utilizou-se cerca de 1 mg de cada uma das amostras de colagénio extraído e foram analisadas em triplicado.



Figura 16 – Espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Thermo Scientific, modelo Delta V Advantage acoplado a um analisador elementar da marca Thermo Scientific, modelo Flash 2000 do Laboratório de Espectrometria de Massa do Laboratório HERCULES.

3.4. Equipamento

- Agitador *Vortex* da marca VWR Collection, modelo VV3;
- Balança analítica da marca Kern, modelo ABT 120-5DM;
- Banho de ultrassons da marca VWR Collection;
- Centrífuga da marca VWR Collection, modelo CompactStar CS4;
- Estufa universal da marca Binder WTC, modelo FP Series;
- Espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Sercon Hydra 20-22 acoplado a um analisador elementar EuroVector, modelo Euro EA 3000;
- Espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Thermo Scientific, modelo Delta V Advantage acoplado a um analisador elementar orgânico da marca Thermo Scientific, modelo Flash 2000;
- Ferramenta multifunções Skil® 125 Watt;
- Liofilizador da marca Telstar, modelo LyoQuest -85;
- Microbalança analítica da marca Sartorius, modelo CPA2P.

3.5. Reagentes

- Acetanilida, Thermo Scientific, Waltham;
- Ácido aspártico STD, Thermo Scientific, Waltham;
- Ácido clorídrico (HCl), 37%, Panreac, Barcelona;
- Água Ultrapura Milli-Q®;
- Cafeína;
- Clorofórmio (CHCl₃), ≥99,8%, Sigma-Aldrich, St. Louis;
- Hidróxido de sódio (NaOH) 40M, Panreac, Barcelona;
- IAEA – 600 Cafeína, IAEA, Viena;
- IAEA-CH-6 Sacarose, IAEA, Viena;
- IAEA-CH-7 Polietileno, IAEA, Viena;
- IAEA-N-1 Sulfato de amónio, IAEA, Viena;
- IAEA-N-2 Sulfato de amónio, IAEA, Viena;
- L-alanina;
- Metanol (CH₃OH) hypergrade LiChrosolv®, Merk-Millipore, Darmstadt;
- Nicotinamida STD, Thermo Scientific, Waltham;
- Protein Standard OAS, Elemental Microanalysis, Okehampton;

- Sorghum Flour Standard OAS, Elemental Microanalysis, Okehampton;
- Sulfanilamida, IVA-Analysentechnik e.K., Düsseldorf.

4. Resultados e Discussão

4.1. A Dieta Romana

A informação escrita sobre o que se bebia e comia no mundo Romano pode ser obtida em textos de diferentes autores e períodos históricos. Por exemplo, a produção de alimentos é relatada em *Naturalis Historia* de Plínio, o Velho, *De Re Rustica* de Columella e *De Agricultura* de Cato; as dietas são descritas em tratados médicos como *Materia Medica* de Dioscórides e podem-se encontrar receitas culinárias em *De Re Coquineria*, atribuído a Apicius. De acordo com as fontes bibliográficas e com os dados arqueológicos disponíveis, admite-se que os cereais, o azeite, o vinho e alguns legumes eram a base da dieta Romana, sendo que o consumo de proteína animal era relativamente escasso. Prowse *et al.* (2004) defendem que os cereais constituíam cerca de 70 a 75% da dieta romana, sendo que a restante dieta era constituída por carne e subprodutos animais. A carne de porco seria a mais consumida pelos romanos, havendo também consumo de carne de ovelhas e cabras (entre 25 a 50%), embora as ovelhas e as cabras fossem criadas principalmente para obter lã e leite, posteriormente utilizado para a produção de queijo. A carne de bovino representava uma pequena componente da dieta dado que estes animais eram utilizados sobretudo como animal de tração. O peixe fresco era considerado um alimento dispendioso, sendo o seu consumo regular restrito a membros da elite da sociedade, sobretudo em regiões localizadas longe da costa. O peixe poderia ser também consumido salgado (*salsamenta*) ou sobre a forma de molhos (por exemplo, *liquamen*, *garum*) que eram usados não só em receitas culinárias como médicas (Prowse, *et al.*, 2004). Os molhos de peixe eram produzidos ao longo das costas marítimas, e em Portugal conhecem-se unidades de produção no Algarve, em Lisboa e em Troia, sendo difundido por todo o mundo Romano através do seu transporte marítimo em ânforas.

Hoje em dia a partir da análise isotópica dos restos osteológicos de um indivíduo ou de um conjunto de indivíduos é possível investigar o tipo de alimentos ingeridos pelo indivíduo ou população no passado, sendo possível perceber qual o seu padrão de subsistência e acesso a recursos alimentares. É também possível verificar se existem diferenças de acordo com o género e hierarquia social e até diferenças ou semelhanças interpopulacionais.

No trabalho aqui apresentado pretendeu-se investigar o regime alimentar de indivíduos do período Tardo-Antigo das vilas Romanas de S. Cucufate e Cegonha sendo

para tal efetuada a análise isotópica, de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$, de colagénio extraído de restos osteológicos humanos e de fauna contemporânea.

4.2. Seleção do Método de Extração de Colagénio

Através da avaliação de diferentes métodos de extração de colagénio foi possível determinar qual o método que conduz aos resultados mais satisfatórios (maior quantidade de colagénio em bom estado de preservação), sendo os principais pontos de interesse a avaliação da necessidade de realização de ultrafiltração e de extração de lípidos utilizados por alguns autores. Os resultados desta avaliação estão representados nas figuras 17 e 18 e na tabela 4. A análise estatística dos resultados indicou que não existem diferenças significativas entre as médias dos diferentes métodos de extração de colagénio utilizados (métodos 1, 2 e 3, ver Figura 14) tanto para o $\delta^{13}\text{C}$ como para o $\delta^{15}\text{N}$ ($p>0,05$) (anexo II). A utilização da mistura de clorofórmio e metanol para remoção de lípidos parece não ter qualquer influência nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$, bem como a realização da ultrafiltração para purificação do colagénio solubilizado. Não foi possível fazer a comparação estatística das médias dos métodos 2 c) e 2 d) e perceber se há diferenças na gelatinização das amostras (a 100 °C durante 17h ou a 70 °C durante 17h), visto que o número de amostras é inferior a três. Em relação ao grau de preservação e contaminação do colagénio verifica-se que estes não sofrem grandes variações em função do método utilizado, podendo considerar-se que o colagénio obtido em todos os métodos apresenta um bom estado de preservação e não tem contaminações significativas, visto que todas as amostras apresentam um rendimento de extração superior a 1% (Van Klinken, 1999), valores consistentes relativamente às composições de carbono e de azoto estabelecidas (13% e 4,8%, respetivamente) (Rand, 2011) e uma razão C:N entre 2,9 e 3,6 (DeNiro, 1985).

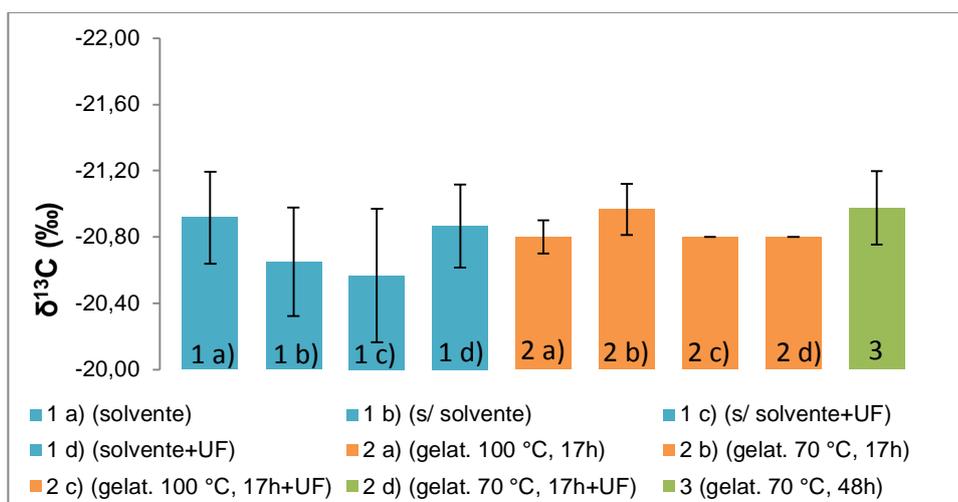


Figura 17 – Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras preparadas pelos diferentes métodos e respetivos desvios-padrão.

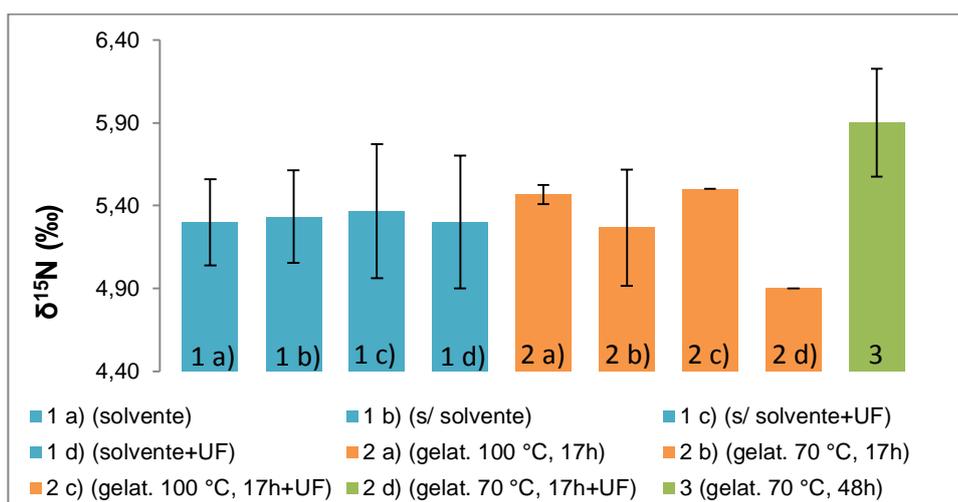


Figura 18 – Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ das amostras preparadas pelos diferentes métodos e respetivos desvios-padrão.

Tabela 4 – Valores médios de rendimento, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, razão C:N e respetivos desvios-padrão das amostras utilizadas no processo de otimização da extração de colagénio.

	Rendimento de Colagénio (%)	σ	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	σ	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	σ	C:N	σ
1 a) (solvente) (B, D, G, H, J e L)	3,54	2,04	-20,92	0,28	+5,30	0,26	3,22	0,04
1 b) (s/ solvente) (A, C, E, F, I e K)	8,60	9,37	-20,65	0,33	+5,33	0,28	3,20	0,06
1 c) (s/ solvente + UF) (C, F e K)	5,30	4,59	-20,57	0,40	+5,37	0,40	3,17	0,06
1 d) (solvente + UF) (G, H e L)	4,46	2,80	-20,87	0,25	+5,30	0,40	3,20	a)
2 a) (gelat. 100 °C, 17h) (M, N e O)	6,01	2,55	-20,80	0,10	+5,47	0,06	3,20	a)
2 b) (gelat. 70 °C, 17h) (P, Q e R)	3,91	1,21	-20,97	0,15	+5,27	0,35	3,23	0,06
2 c) (gelat. 100 °C, 17h+UF) (O)	8,90	a)	-20,80	a)	+5,50	a)	3,20	a)
2 d) (gelat. 70 °C, 17h+UF) (R)	2,81	a)	-20,80	a)	+4,90	a)	3,20	2,81
3 (gelat. 70 °C, 48h) (S, T, U e V)	3,38	0,59	-20,98	0,22	+5,90	0,33	3,23	0,05

a) Não foi possível calcular devido ao número reduzido de réplicas.

Alguns autores (Jorkov, *et al.*, 2007, Thompson, *et al.*, 2008, Sealy, *et al.*, 2014) defendem que a realização de ultrafiltração reduz em cerca de 60 a 90% o rendimento da extração de colagénio e que a utilização de NaOH é suficiente tanto para a remoção de ácidos húmicos como para a remoção de alguns lípidos. Assim, como a diferença de resultados não é significativa, optou-se pelo método 3, onde não são efetuados os passos da remoção de lípidos nem da purificação do colagénio, para a extração de colagénio das amostras em estudo. Outros aspetos importantes do método selecionado são a utilização de HCl 0,5M, que permite que a desmineralização ocorra de forma gradual, e a gelatinização a 70 °C durante 48h, que garante a solubilização completa do colagénio.

4.3. Análise Isotópica de Colagénio Extraído de Restos Osteológicos Arqueológicos das *Villae Romanas* do Monte da Cegonha e de São Cucufate

A partir da análise elementar do colagénio extraído foi possível perceber qual o seu grau de preservação e contaminação. Os resultados obtidos estão representados nas tabelas 5 a 8. Verificou-se que o grau de preservação e contaminação do colagénio é bastante variável, com rendimentos de extração entre 0,03 e 12,46%, o que, tendo por base que o rendimento de extração deve ser igual ou superior a 1% (Van Klinken, 1999),

poderia ser problemático. Apesar disso, obtiveram-se valores consistentes relativamente às composições de carbono e de azoto estabelecidas (13% e 4,8%, respetivamente) (Rand, 2011) e em relação à razão C:N definida como aceitável (2,9 a 3,6) (DeNiro, 1985), mesmo para as amostras que apresentavam um rendimento de extração abaixo do aceitável. Assim, não foi excluída qualquer amostra da análise, tendo presente que possíveis valores inconsistentes podem ser devidos ao baixo teor em colagénio.

4.3.1. Villa Romana do Monte da Cegonha

A partir dos restos osteológicos arqueológicos da *villae* romana do Monte da Cegonha foi possível identificar 25 indivíduos, que se agrupam em indivíduos não-adultos, jovens adultos, adultos e de idade indeterminada. Os resultados obtidos através da análise isotópica para estas amostras estão representados na figura 19 e na tabela 5. Não se conseguiu extrair colagénio das amostras HMC 10, 11 e 12. O valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ (-18,49‰, com um intervalo de -17,67‰ a -19,19‰) e o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ (+10,43‰, com um intervalo de +9,46‰ a +13,17‰) sugerem que os indivíduos desta *villa* tinham uma dieta mista à base de plantas do tipo C_3 e de proteína animal (carne e subprodutos animais).

Na figura 19 é possível observar que a maioria dos dados está agrupada, com a existência de um “outlier” (HMC 5). Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de todos os indivíduos analisados, excluindo este “outlier”, são de -18,53‰, com um intervalo de -17,99‰ a -19,19‰, e de +10,30‰, com um intervalo de +9,46‰ a +11,50‰, respetivamente.

Nesta *villa* foram identificados 5 indivíduos não-adultos, dos quais 3 apresentavam idades iguais ou inferiores a 1 ano (HMC 5, 19 e 20), e 2 com idades inferiores a 5 anos e meio (HMC 3 e 4), à data da sua morte. De acordo com Redfern, *et al.*, 2012, os textos médicos romanos recomendavam que o desmame das crianças ocorresse entre os três meses e os 3 anos de idade, embora em alguns casos começasse pouco antes do primeiro ano de vida e estivesse completo entre os 3-4 anos de idade. Ainda de acordo com este autor, foi possível verificar que em alguns locais do Império Romano o desmame estivesse completo aos 2,5 anos de idade. O “outlier” já identificado corresponde a um indivíduo não-adulto com cerca de 6 meses de idade (HMC 5) que apresenta um incremento de $\delta^{15}\text{N}$ de cerca de +3‰, em relação aos outros indivíduos, consistente com o efeito da amamentação. Estudos efetuados demonstram que os valores de $\delta^{15}\text{N}$, e os de $\delta^{13}\text{C}$ mas em menor escala, estão elevados nas crianças que são amamentadas (Redfern, *et al.*,

2012). A nutrição das crianças que são amamentadas é derivada da proteína presente no leite das suas mães, levando a que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ do seu colagénio correspondam a um nível trófico cima dos valores do colagénio das suas mães (cerca de +3‰ em $\delta^{15}\text{N}$ e 1‰ em $\delta^{13}\text{C}$). Este efeito da amamentação aparece rapidamente após o nascimento verificando-se um ligeiro declínio aquando do início do processo de desmame, sendo que o leite materno é substituído gradualmente por alimentos sólidos. O declínio dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ depende do tipo de práticas de desmame envolvidas, tal como referido anteriormente. Este aumento dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ não se verifica para todos os 3 indivíduos com idades inferiores a 1 ano de vida (HMC 5, 19 e 20). Seria previsível que todas as crianças com esta idade fossem amamentadas o que, com base na análise isotópica efetuada, não parece acontecer.

A análise estatística dos resultados indicou que não existem diferenças significativas entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ entre os 5 indivíduos não-adultos e os indivíduos jovens adultos e adultos ($p>0,05$) (anexo II). No entanto a observação da figura 19 e análise dos dados da tabela 5 parecem indicar que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ dos indivíduos jovens adultos são, em geral, mais elevados do que os dos adultos. Através da análise estatística realizada foi possível confirmar que de facto existem diferenças significativas entre os $\delta^{15}\text{N}$ dos indivíduos jovens adultos e dos indivíduos adultos ($p<0,05$) (anexo II), o que sugere que estes indivíduos teriam uma ingestão de proteína diferente da dos adultos.

Em relação às diferenças entre indivíduos do sexo feminino e masculino, verificou-se que não existem diferenças significativas tanto nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ como nos de $\delta^{15}\text{N}$ ($p>0,05$) (anexo II).

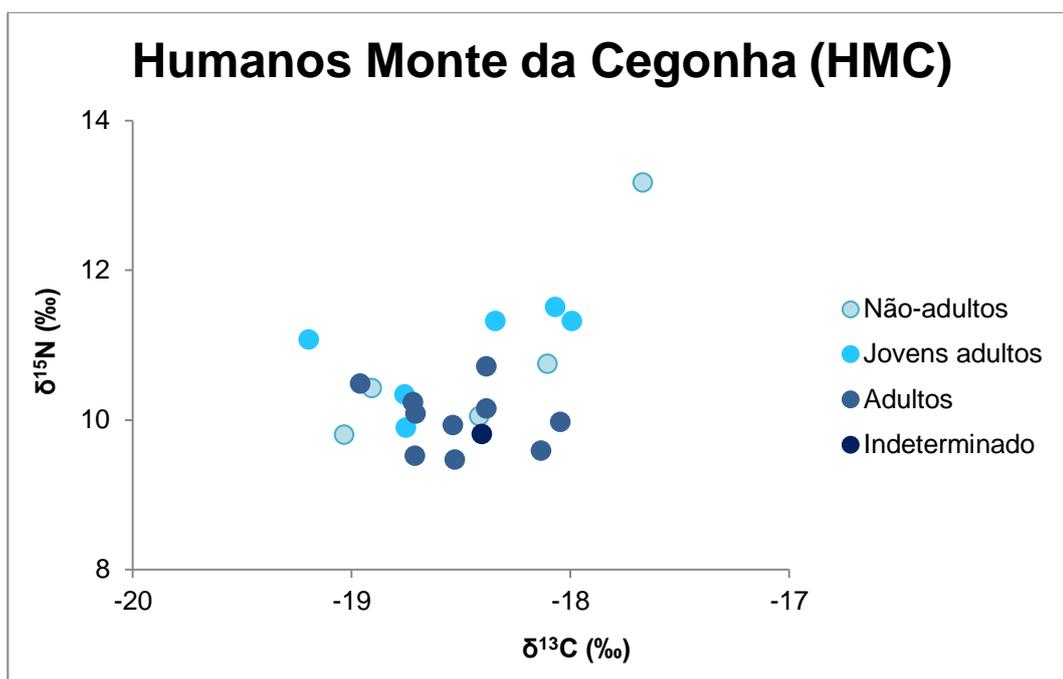


Figura 19 – Razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos da *villa* romana do Monte da Cegonha.

Tabela 5 – Rendimento da extração de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de humanos da *villa* romana do Monte da Cegonha.

Idade	Sexo	Amostra	Rendimento de Colagénio (%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C:N
Feto ou recém-nascido (38 semanas <i>in utero</i> ou 1,5 meses)	Indet.	HMC 19	4,33	-18,42	+10,04	47,89	18,03	3,10
Não-adulto (5 – 5,5 anos)	Indet.	HMC 3	0,79	-19,03	+9,79	21,51	8,89	2,82
Não-adulto (3 – 3,5 anos)	Indet.	HMC 4	1,04	-18,90	+10,42	35,31	14,70	2,80
Não-adulto (~6 meses)	Indet.	HMC 5	2,19	-17,67	+13,17	43,29	16,67	3,03
Não-adulto (6 meses – 1 ano)	Indet.	HMC 20	5,44	-18,10	+10,74	46,84	17,78	3,07
Jovem adulto	Feminino	HMC 2	0,95	-19,19	+11,06	12,33	4,75	3,03
Jovem adulto (<27 anos)	Feminino	HMC 6	3,81	-18,07	+11,50	36,39	14,35	2,96
Jovem adulto (<27 anos)	Feminino	HMC 7	-	-18,34	+11,31	29,53	11,42	3,02
Jovem adulto	Indet.	HMC 16	12,46	-17,99	+11,31	-	29,37	3,89
Jovem adulto	Indet.	HMC 17	11,74	-18,75	+9,88	-	30,38	3,86
Jovem adulto	Indet.	HMC 24	1,66	-18,76	+10,33	15,94	5,78	3,22
Adulto (~40 anos)	Feminino	HMC 8	2,77	-18,38	+10,14	39,61	15,50	2,98
Adulto (<23 anos)	Feminino	HMC 13	4,65	-18,53	+9,92	36,68	13,73	3,12
Adulto	Masculino	HMC 14	8,78	-18,96	+10,48	38,90	14,68	3,09
Adulto	Masculino	HMC 15	6,18	-18,13	+9,58	88,46	26,62	3,88
Adulto	Masculino	HMC 18	2,29	-18,71	+9,51	41,21	12,08	3,98
Adulto	Masculino	HMC 21	5,85	-18,53	+9,46	36,45	14,71	2,90
Adulto	Masculino	HMC 22	4,58	-18,72	+10,23	31,63	11,88	3,10
Adulto	Masculino	HMC 1	1,55	-18,38	+10,71	29,52	10,52	3,28
Adulto	Indet.	HMC 9	2,90	-18,04	+9,96	37,48	14,02	3,12
Adulto	Indet.	HMC 25	6,03	-18,70	+10,07	42,58	16,24	3,06
Indet.	Indet.	HMC 23	9,87	-18,40	+9,80	38,54	14,67	3,07

Indet.= Indeterminado

Na determinação das dietas do passado é essencial analisar restos osteológicos de fauna contemporânea dos restos osteológicos humanos, de forma a determinar as razões isotópicas das fontes de alimentação potencialmente consumidas pelos indivíduos humanos. Assim, procedeu-se à extração de colagénio de amostras faunísticas recolhidas

nesta *villa* romana. Os resultados da análise isotópica destas amostras estão representados na figura 20 e na tabela 6. Não se conseguiu extrair colagénio das amostras FMC 4, 7, 8 e 10. O valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ de todas as amostras de fauna é de $-19,97\text{‰}$, com um intervalo de $-18,77\text{‰}$ a $-21,42\text{‰}$; o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ é de $+6,72\text{‰}$, com um intervalo de $+4,69\text{‰}$ a $+7,97\text{‰}$.

Nesta *villa* romana pode dividir-se a fauna existente em duas categorias, os animais herbívoros e o porco (animal omnívoro). Os animais herbívoros podem ainda ser selvagens (coelho e veado) ou domesticados (bovino, cabra e ovelha ou cabra). Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ ($\delta^{13}\text{C} = -20,96\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = +4,96\text{‰}$) dos animais herbívoros selvagens sugerem que estes tinham uma dieta à base de plantas do tipo C_3 . Os animais herbívoros domesticados apresentam valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ de $-19,85\text{‰}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de $+6,88\text{‰}$.

Na figura 20 é possível observar que os herbívoros domesticados apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ e, sobretudo, de $\delta^{15}\text{N}$ elevados, em relação aos herbívoros selvagens. Sabe-se que um dos fatores que pode afetar diretamente os valores de $\delta^{15}\text{N}$ é a adubação dos solos, através da utilização de estrume animal, a fim de restaurar os nutrientes e aumentar o rendimento de cultivo (Bogaard, *et al.*, 2007). Os valores elevados de $\delta^{15}\text{N}$ sugerem que os herbívoros domesticados ingeriam cereais previamente fertilizados através do solo. Os valores elevados de $\delta^{13}\text{C}$ revelam um incremento de cerca de $+1\text{‰}$, relativamente ao que seria de esperar para uma dieta exclusivamente em C_3 sugerindo que, apesar destes animais se alimentarem sobretudo de plantas do tipo C_3 , talvez existisse algum consumo de plantas do tipo C_4 , como por exemplo o milho painço. Estudos revelam que o milho painço (que cresce em regiões áridas) era consumido tanto por animais como por humanos, sendo misturado com legumes e consumido por indivíduos pobres e escravos, e possivelmente era utilizado por estes para alimentar os animais domesticados (Tafari, *et al.*, 2009).

O porco apresenta valores de $\delta^{13}\text{C}$ de $-19,73\text{‰}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de $+7,97\text{‰}$ que sugerem que este tem uma dieta sobretudo à base de plantas do tipo C_3 , mas que poderá incluir algum consumo de plantas do tipo C_4 devido ao incremento de cerca de $+1\text{‰}$ de $\delta^{13}\text{C}$ em relação aos herbívoros selvagens, sendo que os valores elevados de $\delta^{15}\text{N}$ parecem indicar que este também seria alimentado com restos da alimentação humana.

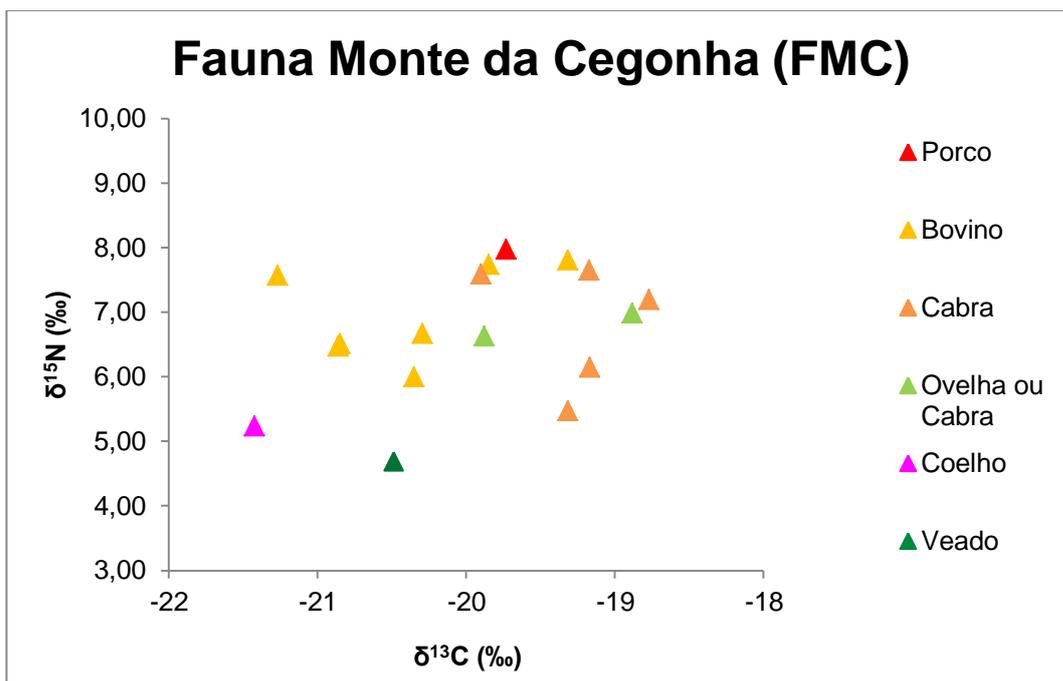


Figura 20 – Razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos faunísticos do Monte da Cegonha.

Tabela 6 – Rendimento de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras faunísticas do Monte da Cegonha.

Espécie	Idade	Amostra	Rendimento de Colagénio (%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C:N
Veado	Adulto	FMC 2	1,10	-20,49	+4,69	34,04	12,99	3,06
Coelho	Adulto	FMC 21	4,56	-21,43	+5,23	34,00	13,16	3,01
Bovino	Adulto	FMC 1	0,03	-21,27	+7,57	26,39	8,75	3,52
Bovino	Adulto	FMC 3	2,73	-20,35	+5,99	35,65	13,82	3,01
Bovino	Adulto	FMC 5	0,87	-20,30	+6,66	30,54	11,52	3,09
Bovino	Adulto	FMC 12	0,97	-20,86	+6,47	-	-	-
Bovino	Adulto	FMC 13	2,09	-20,85	+6,51	-	-	-
Bovino	Adulto	FMC 16	6,03	-19,32	+7,80	-	-	-
Bovino	Adulto	FMC 19	4,06	-19,85	+7,74	30,66	11,91	3,00
Cabra	Juvenil (6-12 meses)	FMC 20	8,79	-19,17	+6,15	35,92	13,91	3,01
Cabra	Jovem adulto (~12 meses)	FMC 9	3,24	-19,17	+7,64	34,29	13,13	3,05
Cabra	Adulto (>2 anos)	FMC 15	8,03	-18,77	+7,19	-	-	-
Cabra	Adulto (3-4 anos)	FMC 6	5,95	-19,90	+7,59	35,58	13,81	3,01
Cabra	Adulto (6-8 anos)	FMC 14	0,55	-19,32	+5,46	-	-	-
Ovelha ou Cabra	Adulto (>1 ano e meio)	FMC 11	1,97	-18,89	+6,98	-	-	-
Ovelha ou Cabra	Adulto	FMC 17	4,89	-19,88	+6,63	35,51	13,74	3,02
Porco	Jovem adulto (1-2 anos)	FMC 18	7,67	-19,73	+7,97	35,26	13,79	2,98

A partir da comparação dos resultados da análise isotópica das amostras de humanos com os resultados das amostras faunísticas representados na figura 21, tudo indica que os indivíduos humanos desta *villa* romana tinham uma dieta mista à base sobretudo de plantas do tipo C_3 e de proteína animal (carne e subprodutos animais), visto que apresentam um incremento em $\delta^{15}\text{N}$ de cerca de +3‰ em relação à fauna existente no local. No que se refere aos valores de $\delta^{13}\text{C}$ verifica-se que há um incremento de cerca de +1‰ consistente com o nível trófico dos indivíduos, em relação aos animais por eles consumidos, podendo este incremento dever-se também ao consumo pontual de plantas do tipo C_4 , tal como o milho painço. Apesar de não poder ser excluído, o consumo de produtos de peixe não deve ter sido muito significativo já que a população apresenta, em geral, valores de $\delta^{15}\text{N}$ que são muito baixos.

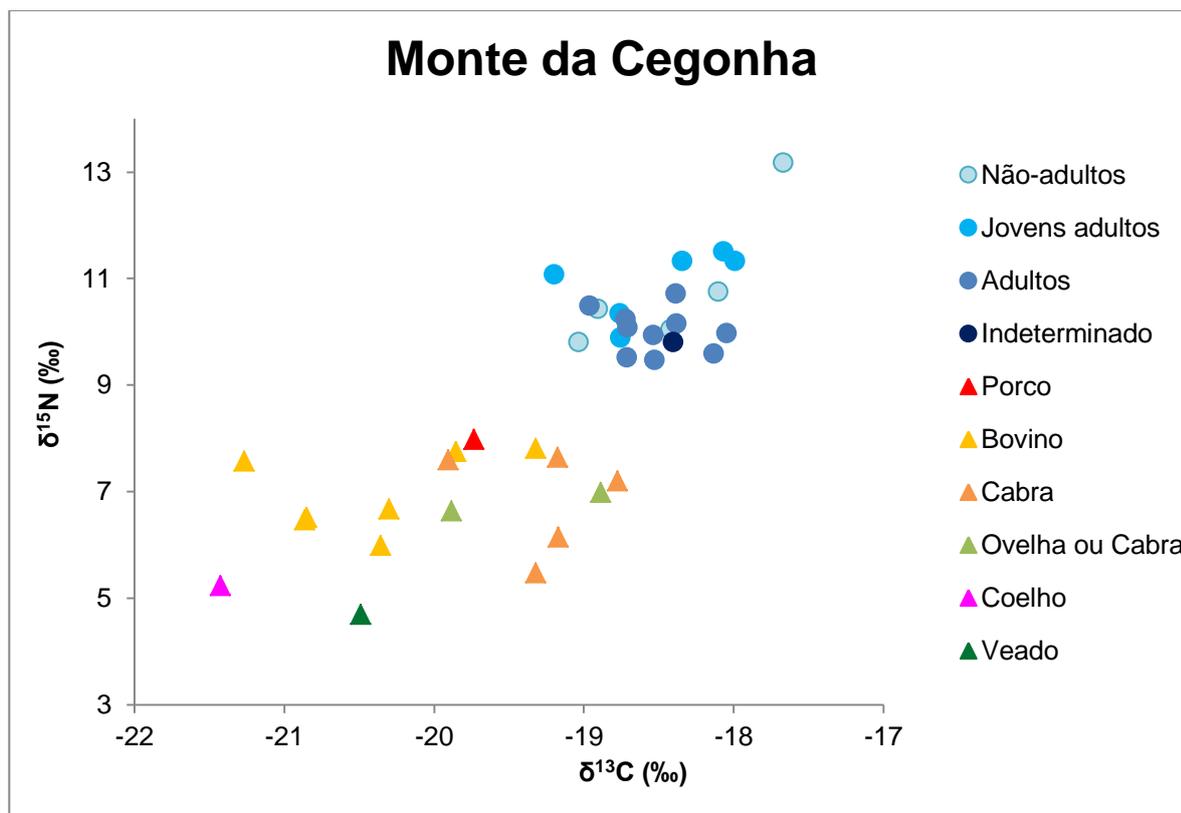


Figura 21 – Comparação entre as razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos e faunísticos do Monte da Cegonha.

4.3.2. Villae Romana de São Cucufate

De acordo com os restos osteológicos arqueológicos da *villae* romana de São Cucufate identificaram-se 13 indivíduos, que se agrupam em indivíduos não-adultos e adultos, mas dos quais não se conseguiu extrair colagénio das amostras HSC 6, 8 e 9. Os resultados de análise isotópica dos restos osteológicos dos 10 indivíduos remanescentes (1 não-adulto e 9 adultos) estão representados na figura 22 e na tabela 7. O valor médio de todos os indivíduos analisados é de $\delta^{13}\text{C}$ -18,92‰, com um intervalo de -18,58‰ a -19,21‰ e o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ é de +9,55‰, com um intervalo de +8,20‰ a +10,47‰. Estes valores sugerem que os indivíduos da *villa* de São Cucufate tinham uma dieta mista à base de plantas do tipo C_3 e de proteína animal (carne e subprodutos animais).

Na figura 22 é possível observar que os dados estão agrupados, apesar da existência de um indivíduo não-adulto com cerca de 18 ± 6 meses (HSC 11). Devido à dimensão da amostra não foi possível confirmar estatisticamente se este indivíduo difere ou não dos indivíduos adultos, mas, observando a figura 22, os resultados sugerem que este indivíduo estaria em processo de desmame, visto que não apresenta um incremento

de $\delta^{15}\text{N}$ característico do efeito de amamentação, em relação aos restantes indivíduos. Tal como referido anteriormente, Redfern *et al.* (2012) referem que o processo de desmame poderia ter início entre os três meses e os 3 anos de idade.

Observando a figura 22 é ainda possível observar que dois indivíduos apresentam valores inferiores de $\delta^{15}\text{N}$ (HSC 7 e 13, indivíduos do sexo feminino), o que poderá dever-se a um menor consumo de proteína animal, em comparação com os restantes indivíduos.

Não foi possível realizar a análise estatística para os indivíduos desta *villa* romana, visto que a dimensão da amostra não é suficiente para verificar se há ou não diferenças significativas entre os indivíduos, com base na sua idade e sexo.

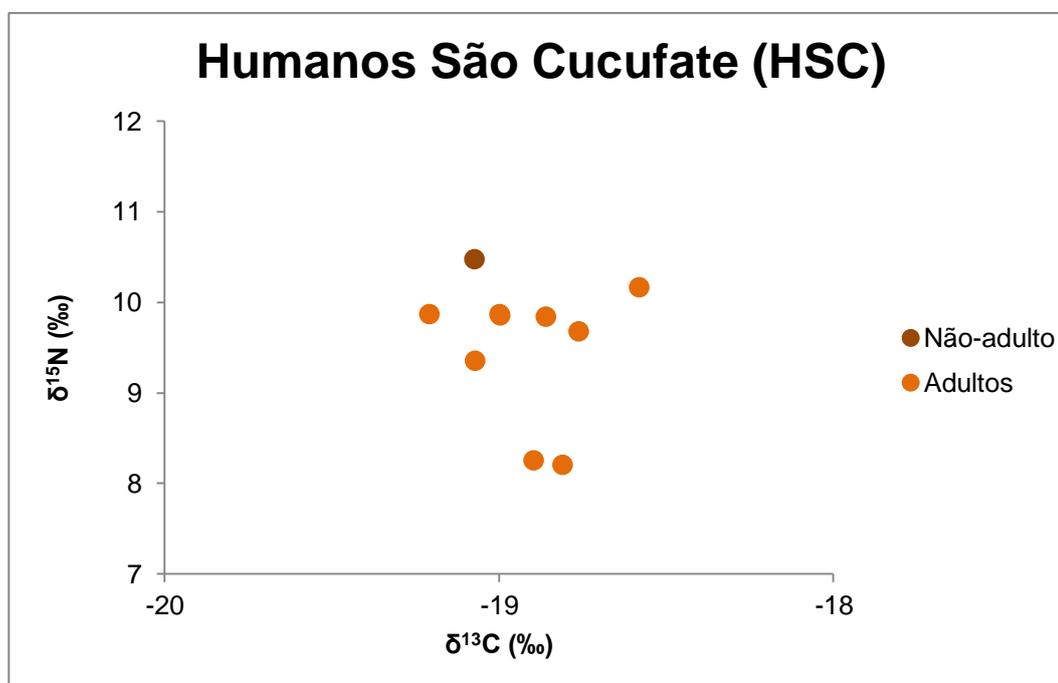


Figura 22 – Valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos de São Cucufate.

Tabela 7 – Rendimento de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de humanos de São Cucufate.

Idade	Sexo	Amostra	Rendimento de Colagénio (%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C:N
Não-adulto (18±6 meses)	Indet.	HSC 11	8,63	-19,07	+10,47	47,91	17,76	3,15
Adulto (30-34 anos)	Feminino	HSC 1	5,05	-18,58	+10,16	47,70	18,72	2,97
Adulto (35-39 anos)	Feminino	HSC 5	2,41	-18,86	+9,83	48,94	18,06	3,16
Adulto (35-44 anos)	Feminino	HSC 4	7,41	-19,00	+9,85	45,73	17,83	2,99
Adulto (40-44 anos)	Feminino	HSC 12	2,61	-19,21	+9,86	49,81	18,39	3,16
Adulto	Feminino	HSC 7	5,05	-18,89	+8,25	46,25	17,19	3,14
Adulto	Feminino	HSC 13	7,27	-18,81	+8,20	48,69	18,17	3,13
Adulto (40-44 anos)	Masculino	HSC 3	4,45	-18,76	+9,68	52,43	20,61	2,97
Adulto (Indet.)	Indet.	HSC 2	1,58	-19,00	+9,86	54,45	21,08	3,01
Adulto	Indet.	HSC 10	0,57	-19,07	+9,35	37,26	13,29	3,27

Indet. = Indeterminado

Tal como na *villa* romana do Monte da Cegonha, procedeu-se à extração de colagénio das amostras faunísticas recolhidas na *villa* romana de São Cucufate. Os resultados da análise isotópica das amostras estão representados na figura 23 e na tabela 8. Neste caso foi analisado o colagénio de 19 amostras. O valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ nestas amostras é de -19,43‰, com um intervalo de -18,33‰ a -20,56‰, enquanto o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ é de +6,14‰, com um intervalo de +3,53‰ a +9,63‰.

Nesta *villa* romana pode dividir-se a fauna existente em três categorias, os animais herbívoros, os cães e o porco. Os animais herbívoros podem ainda ser selvagens (veados) ou domesticados (cabra e ovelha ou cabra). Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ ($\delta^{13}\text{C}$ = -20,44‰, $\delta^{15}\text{N}$ = +3,78‰) dos animais herbívoros selvagens sugerem que estes tinham uma dieta à base de plantas do tipo C_3 . Os animais herbívoros domesticados apresentam valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ de -19,69‰ e de $\delta^{15}\text{N}$ de +5,07‰, que são consistentes com o seu nível trófico, sugerindo uma dieta à base de plantas do tipo C_3 .

Na figura 23 e tabela 8 é possível observar que os herbívoros domesticados não apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ tão elevados quanto os da *villa* romana da Cegonha, o que leva a pensar que os solos de São Cucufate não seriam tão adubados. Contudo, estes herbívoros domesticados apresentam um incremento em $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de +1‰ em

relação aos selvagens, sugerindo que estes animais tinham uma alimentação maioritariamente à base de plantas do tipo C₃, mas que talvez existisse algum consumo de plantas do tipo C₄, como é exemplo o milho painço.

Os cães apresentam valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ de $-18,42\text{‰}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de $+9,41\text{‰}$. Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ destes animais são os mais elevados de toda a fauna estudada, sugerindo uma dieta à base de carne e ossos sob a forma de restos de comida resultantes da alimentação humana (Fuller, *et al.*, 2012).

O porco apresenta valores de $\delta^{13}\text{C}$ de $-19,72\text{‰}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de $+6,24\text{‰}$ que sugerem que este tem uma dieta à base de plantas do tipo C₃ e de restos da alimentação humana.

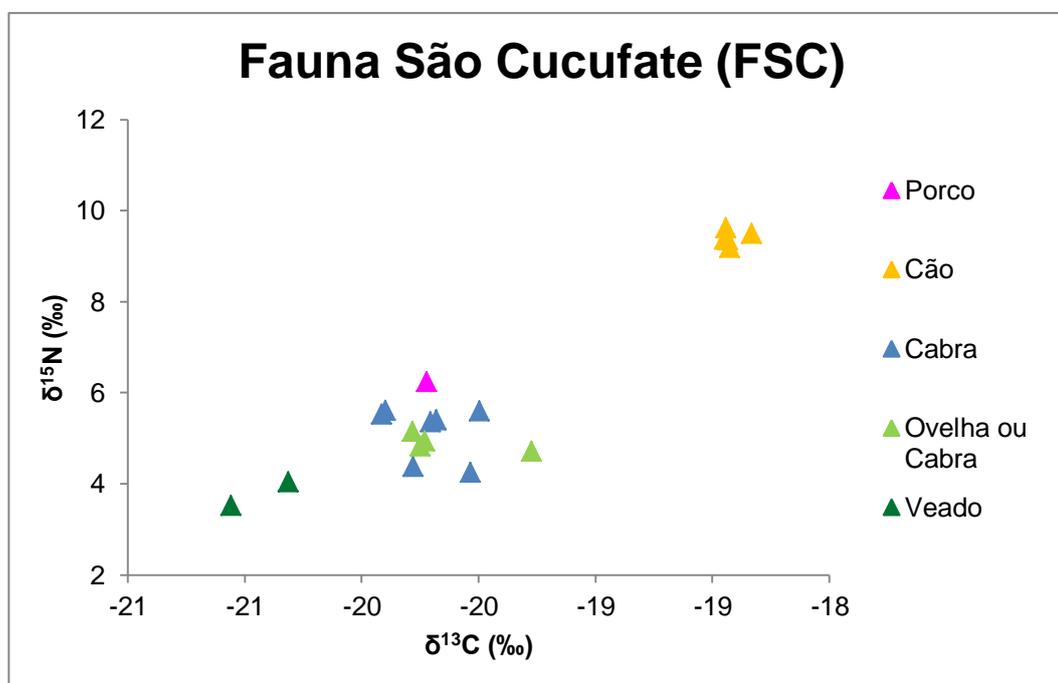


Figura 23 – Valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos faunísticos de São Cucufate.

Tabela 8 – Rendimento de colagénio e resultados da análise elementar e $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras faunísticas de São Cucufate.

Espécie	Idade	Amostra	Rendimento de Colagénio (%)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C:N
Veado	Adulto	FSC 1	0,80	-20,32	+4,04	50,12	19,16	3,05
Veado	Adulto	FSC 18	1,82	-20,56	+3,53	44,49	17,17	3,02
Cabra	Adulto (>10 meses)	FSC 6	3,39	-19,50	+5,60	37,83	14,93	2,96
Cabra	Adulto (>10 meses)	FSC 7	1,15	-19,92	+5,53	38,77	15,06	3,00
Cabra	Jovem adulto (10-36 meses)	FSC 8	10,19	-19,90	+5,61	35,18	13,95	2,94
Cabra	Adulto (2-3 anos)	FSC 3	9,57	-19,68	+5,40	51,43	19,90	3,02
Cabra	Adulto (3-4 anos)	FSC 11	2,57	-19,54	+4,25	44,01	16,96	3,03
Cabra	Adulto (3-4 anos)	FSC 12	3,19	-19,78	+4,37	43,90	16,88	3,03
Cabra	Adulto	FSC 4	6,97	-19,71	+5,35	49,67	19,18	3,02
Ovelha ou Cabra	Adulto (4-6 anos)	FSC 13	3,42	-19,27	+4,72	46,07	17,70	3,04
Ovelha ou Cabra	Adulto (4-6 anos)	FSC 14	3,13	-19,73	+4,94	49,93	19,15	3,04
Ovelha ou Cabra	Adulto	FSC 15	4,61	-19,78	+5,15	48,05	18,42	3,04
Ovelha ou Cabra	Adulto	FSC 16	5,11	-19,75	+4,83	48,09	18,44	3,04
Cão	Jovem adulto (<15 meses)	FSC 2	3,50	-18,45	+9,37	47,09	17,71	3,10
Cão	Jovem adulto (<1 ano e meio)	FSC 9	4,39	-18,43	+9,20	37,30	14,78	2,94
Cão	Jovem adulto (<1 ano e meio)	FSC 10	2,28	-18,44	+9,36	40,55	15,97	2,96
Cão	Adulto (>6 meses)	FSC 19	6,91	-18,33	+9,50	44,71	17,17	3,04
Cão	Adulto (>13 meses)	FSC 17	3,11	-18,44	+9,63	48,17	18,46	3,04
Porco	Adulto (>1 ano)	FSC 5	4,07	-19,72	+6,24	38,27	15,00	2,98

A partir da comparação dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das amostras de humanos com os resultados das amostras faunísticas representados na figura 24, é possível observar que os indivíduos da *villa* romana de São Cucufate se alimentavam à base de uma dieta mista, constituída por plantas do tipo C_3 e por proteína animal (carne e subprodutos animais), visto que apresentam um incremento em $\delta^{15}\text{N}$ de cerca de +3‰ em relação às cabras, às ovelhas ou cabras, aos veados e ao porco. Em relação aos valores

de $\delta^{13}\text{C}$ verifica-se que há um incremento de cerca de +1‰ consistente com o nível trófico dos indivíduos, em relação aos animais por eles consumidos, podendo este incremento dever-se em parte ao consumo pontual de plantas do tipo C_4 , como é o caso do milho painço. Observando a figura 24 verifica-se que os cães apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ semelhantes aos indivíduos humanos, sugerindo que estes animais tinham uma dieta à base de carne e ossos sob a forma de restos de comida resultantes da alimentação humana (Fuller, *et al.*, 2012). Apesar de não poder ser excluído, o consumo de produtos de peixe não deve ter sido muito significativo já que a população apresenta, em geral, valores de $\delta^{15}\text{N}$ que são muito baixos

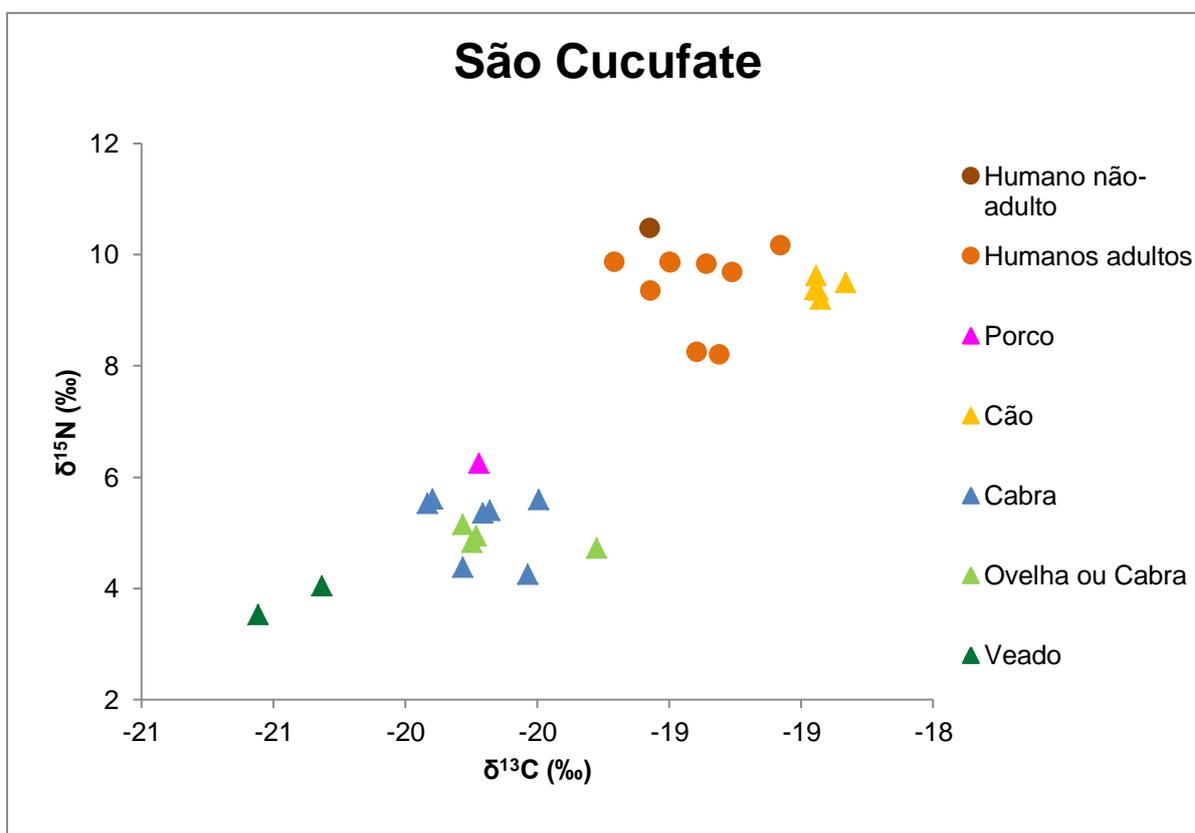


Figura 24 – Comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos restos osteológicos humanos e faunísticos de São Cucufate.

4.3.3. Comparação das Análises Isotópicas dos Restos Osteológicos das duas Villae Romanas

Os resultados das análises isotópicas obtidos para as duas *villae* romanas estão representados na figura 25. Os resultados sugerem que as duas populações tinham uma dieta semelhante, à base de plantas do tipo C_3 e de proteína animal (carne e subprodutos

animais), apesar de se verificar um incremento em $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de +1‰ por parte dos humanos da *villa* do Monte da Cegonha. Esta diferença pode resultar de um maior consumo de plantas do tipo C_4 por parte destes indivíduos ou pelo consumo de proteína animal que reflita um consumo deste tipo de plantas. Como seria de esperar, verifica-se um incremento em $\delta^{15}\text{N}$ por parte dos humanos da *villa* do Monte da Cegonha, que pode em parte ser devida à existência de 5 indivíduos não-adultos que se demonstrou terem um consumo diferenciado de proteína. Na *villa* romana de São Cucufate apenas foi encontrado um indivíduo não-adulto, cujos resultados de análise isotópica sugerem que este estaria em processo de desmame. Estas diferenças de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ foram confirmadas através da análise estatística, verificando-se que existem diferenças significativas entre as populações das duas *villae* ($p < 0,05$) (anexo II). No que se refere às diferenças com base no sexo dos indivíduos das duas *villae*, não foi possível realizar a análise estatística visto que o número de amostras não o permitia.

Ainda sobre a alimentação dos humanos das duas *villae* romanas, não é possível tirar conclusões precisas sobre a ingestão de peixe e seus derivados. Apesar dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ relativamente altos, aqui tentativamente explicados pela introdução das plantas em C_4 , poderem ser também justificados pelo consumo de peixe, os valores relativamente baixos de $\delta^{15}\text{N}$ das amostras sugerem que a proteína ingerida deveria ser maioritariamente de origem terrestre.

Em relação aos resultados da fauna encontrada nas duas *villae*, e observando a figura 24, sugere-se que a fauna da *villa* romana do Monte da Cegonha apresenta valores mais elevados de $\delta^{15}\text{N}$, em relação à fauna da *villa* de São Cucufate, possivelmente devido à adubação dos solos nesta *villa* ser mais intensa (Bogaard, *et al.*, 2007). Estes valores elevados de $\delta^{15}\text{N}$ vão posteriormente refletir-se num aumento de $\delta^{15}\text{N}$ nos valores dos humanos, que como se referiu anteriormente, são mais elevados do que os da *villa* romana de São Cucufate. A análise estatística entre os animais herbívoros das duas *villae* romanas permitiu confirmar que existem diferenças significativas apenas nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ ($p < 0,05$) (anexo II). Em relação à restante fauna (porcos e cães) não foi possível realizar a análise estatística devido ao número reduzido de amostras. É importante destacar que os cães existentes na *villa* romana de São Cucufate tinham uma dieta bastante semelhante à dos humanos da *villa* de São Cucufate e de alguns indivíduos adultos da *villa* romana do Monte da Cegonha.

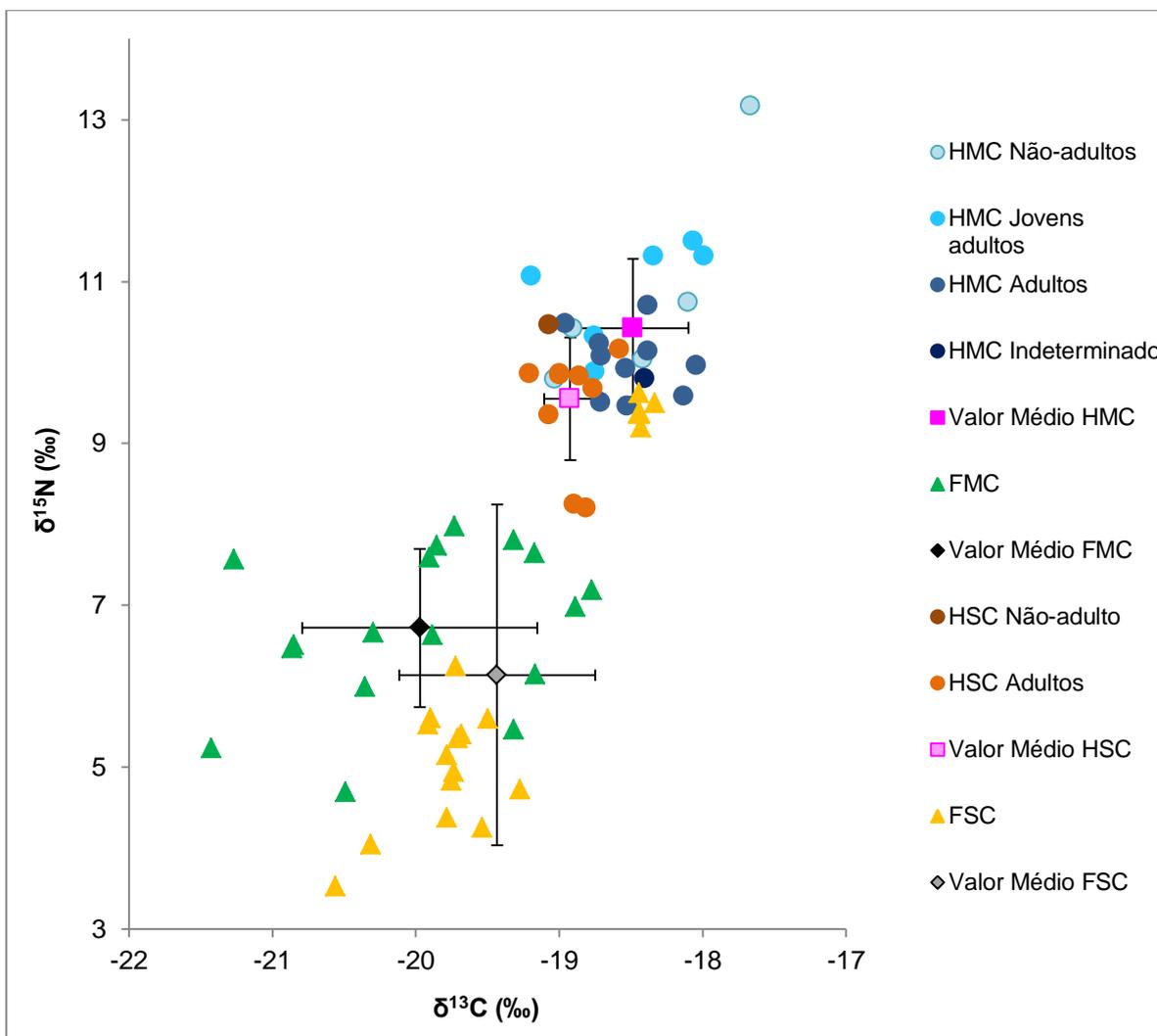


Figura 25 – Comparação entre as razões isotópicas dos restos osteológicos humanos e faunísticos do Monte da Cegonha e de São Cucufate e respetivos valores médios e desvios-padrão.

Por fim, compararam-se os resultados obtidos para as duas *villae* romanas com resultados obtidos em estudos semelhantes a este, estando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ representados na figura 26 e na tabela 9. Estes estudos são todos referentes à época romana (Prowse, *et al.*, 2004, Chenery, *et al.*, 2010, Redfern, *et al.*, 2010, Müldner, *et al.*, 2011, Pollard, *et al.*, 2011, Stevens, *et al.*, 2012, Killgrove & Tykot, 2013), sendo que um deles se refere ao período Tardo-Antigo (Rutgers, *et al.*, 2009). Os referidos estudos foram realizados a partir de restos osteológicos humanos e também faunísticos recolhidos em Inglaterra (Chenery, *et al.*, 2010, Redfern, *et al.*, 2010, Müldner, *et al.*, 2011, Pollard, *et al.*, 2011, Stevens, *et al.*, 2012) e Itália (Prowse, *et al.*, 2004, Rutgers, *et al.*, 2009, Killgrove & Tykot, 2013).

Em todos os estudos referidos é possível observar que existe uma relação de nível trófico entre a fauna e as populações, tal como observado nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate. Na maioria destes estudos a dieta das populações é descrita como sendo baseada maioritariamente em plantas do tipo C₃ e carne e subprodutos animais. Em alguns estudos, é referida a introdução de produtos de origem marinha ou de água doce, sendo estes relativos a locais junto à costa (Prowse, *et al.*, 2004, Rutgers, *et al.*, 2009, Müldner, *et al.*, 2011). Em relação à comparação dos resultados das análises isotópicas de humanos das *villae* romanas do Monte da Cegonha e de S. Cucufate com os das outras populações estudadas, independentemente da sua localização geográfica, a figura 26 sugere que os resultados são bastante semelhantes tanto nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ como nos de $\delta^{15}\text{N}$, com aqueles que referem um consumo de plantas do tipo C₃ e com algum consumo de carne e seus derivados (Pollard, *et al.*, 2011, Redfern, *et al.*, 2012, Killgrove & Tykot, 2013).

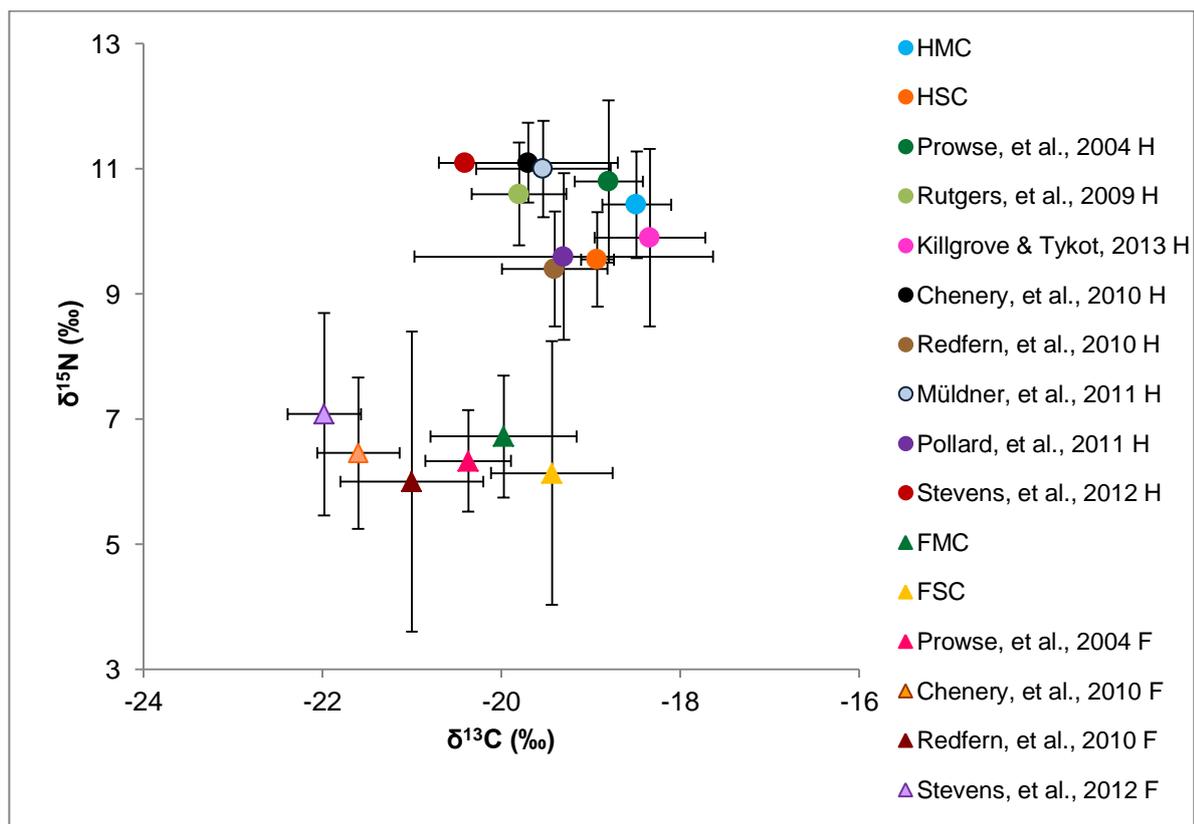


Figura 26 – Comparação dos resultados obtidos nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate com estudos realizados por Prowse, *et al.* (2004), Rutgers, *et al.* (2009), Chenery, *et al.* (2010), Redfern, *et al.* (2010), Müldner, *et al.* (2011), Pollard, *et al.* (2011), Stevens, *et al.* (2012) e Killgrove & Tykot, (2013) (H = Humanos, F = Fauna).

Tabela 9 – Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de estudos realizados por Prowse, *et al.* (2004), Rutgers, *et al.* (2009), Chenery, *et al.* (2010), Redfern, *et al.* (2010), Müldner, *et al.* (2011), Pollard, *et al.* (2011), Stevens, *et al.* (2012) e Killgrove & Tykot, (2013).

Autor	Local	Período	Restos osteológicos	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Prowse, <i>et al.</i>, 2004	Itália	Romano	Humanos	-18,80	+10,80
			Faunísticos	-20,37	+6,33
Rutgers, <i>et al.</i>, 2009	Itália	Paleocristão	Humanos	-19,80	+10,60
Killgrove & Tykot, 2013	Itália	Romano	Humanos	-18,34	+9,90
Chenery <i>et al.</i>, 2010	Inglaterra	Romano	Humanos	-19,70	+11,10
			Faunísticos	-21,60	+6,46
Redfern <i>et al.</i>, 2010	Inglaterra	Imperial	Humanos	-19,40	+9,40
			Faunísticos	-21,0	+6,00
Müldner, <i>et al.</i>, 2011	Inglaterra	Romano	Humanos	-19,53	+11,00
Pollard, <i>et al.</i>, 2011	Inglaterra	Romano	Humanos	-19,30	+9,60
Stevens, <i>et al.</i>, 2012	Inglaterra	Romano	Humanos	-20,40	+11,10
			Faunísticos	-21,98	+7,08

5. Conclusões

Neste trabalho tinha-se como objetivo a obtenção de informação sobre a dieta romana do período Tardo-Antigo da região de Pax Julia (Beja), através da análise isotópica de material osteológico recolhido nas *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate.

Através dos restos osteológicos das duas populações tardo-antigas verificou-se que, apesar da sua proximidade geográfica, os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ diferem estatisticamente entre si. Esta diferença pode, provavelmente, ser atribuída às diferenças observadas nos valores isotópicos das respetivas faunas domesticadas, que seriam usadas como fonte de proteína para a alimentação humana. O valor relativamente elevado de $\delta^{13}\text{C}$ dos herbívoros domesticados quando comparados com os selvagens, pode provavelmente ser explicado pelo consumo de plantas do tipo C_4 (milho painço, por exemplo), enquanto os valores relativamente elevados de $\delta^{15}\text{N}$ serão provavelmente devidos à utilização de estrume dos animais para fertilização dos solos, o que ocorreria nas duas *villae*, mas que seria mais intenso na *villa* romana do Monte da Cegonha. A utilização para alimentação animal e/ou consumo humano de plantas do tipo C_4 , como o milho painço, é referida por outros autores para justificar em parte os resultados observados nas razões isotópicas de restos osteológicos humanos de populações no sul de Inglaterra (Müldner, *et al.*, 2011) e Itália (Killgrove & Tykot, 2013).

Os resultados apresentados permitem concluir que a alimentação das populações das *villae* romanas do Monte da Cegonha e de São Cucufate era baseada sobretudo em plantas do tipo C_3 , tais como trigo, cevada, centeio e a maioria das frutas e legumes, e de carne e subprodutos animais, tais como leite e queijo. Não é possível com os dados obtidos inferir sobre o consumo de peixe de água doce ou salgada. No entanto, os valores relativamente baixos de $\delta^{15}\text{N}$ permitem afirmar que esse consumo não deveria ocorrer com muita frequência. Deve salvaguardar-se a utilização de molhos de peixe, frequente nas populações romanas. No entanto, análises isotópicas de *garum* efetuadas por Prowse, *et al.* (2004) demonstraram que estes molhos não iriam ter um efeito muito significativo no $\delta^{15}\text{N}$ do colagénio do consumidor, já que eram produzidos com espécies de peixe pequeno e que pertencem a níveis tróficos baixos da cadeia alimentar em ambientes marinhos (figura 7).

6. Referências Bibliográficas

- Alarcão, J., Étienne, R. & Mayet, F. (1990) *Les Villas Romaines de S. Cucufate (Portugal)*, E. de Boccard, Paris.
- Alfenim, R. & Lopes, M. (1992) A Basílica Paleocristã/Visigótica do Monte da Cegonha (Vidigueira), in *IV Reunió d' Arqueologia Cristiana Hispànica* (Catalans, I. d. E., Ed.), pp 389-398, Lisboa.
- Amabis, J. M. & Martho, G. R. (2004) *Biologia das células, Volume 1: Origem da vida, citologia, histologia e embriologia*, Vol. 1, 2ª ed., Moderna, São Paulo.
- Ambrose, S. (1990) Preparation and Characterization of Bone and Tooth Collagen for Isotopic Analysis, in *Journal of Archaeological Science*, pp 431-451.
- Bocherens, H., Fizet, M., Mariotti, A., Lange-Badre, B., Vandermeersch, B., Borel, J. & Bellon, G. (1991). Isotopic Biogeochemistry (^{13}C , ^{15}N) of fossil vertebrate collagen: application to the study of a past food web including Neanderthal man. *Journal of Human Evolution*. 20, 481-492.
- Bogaard, A., Heaton, T. H. E., Poulton, P. & Merbach, I. (2007). The impact of manuring on nitrogen isotope ratios in cereals: archaeological implications for reconstruction of diet and crop management practices. *Journal of Archaeological Science*. 34, 335-343.
- Britton, K., Müldner, G. & Bell, M. (2008). Stable isotope evidence for salt-marsh grazing in the Bronze Age Severn Estuary, UK: implications for palaeodietary analysis at coastal sites. *Journal of Archaeological Science*. 35, 2111-2118.
- Brown, T. & Brown, K. (2011) *Biomolecular Archaeology - An Introduction*, Wiley-Blackwell.
- Brown, T., Nelson, D., Vogel, J. & Southon, J. (1988). Improved Collagen Extraction by Modified Longin Method. *Radiocarbon*. 30, 171-177.
- Budd, C., Lillie, M., Alpaslan-Roodenberg, S., Karul, N. & Pinhasi, R. (2013). Stable isotope analysis of Neolithic and Chalcolithic populations from Aktopraklik, northern Anatolia. *Journal of Archaeological Science*. 40, 860-867.

- Carter, J., Lock, C., Meier-Augenstein, W., Kemp, H., Schneiders, S., Stem, L. & van der Peijl, G. (2011) *Good Practice Guide for Isotope Ratio Mass Spectrometry*, 1ª ed., Forensic Isotope Ratio Mass Spectrometry Network.
- Chenery, C., Müldner, G., Evans, J., Eckardt, H. & Lewis, M. (2010). Strontium and stable isotope evidence for diet and mobility in Roman Gloucester, UK. *Journal of Archaeological Science*. 37, 150-163.
- DeNiro, M. (1985). Postmortem preservation and alteration of *in vivo* bone collagen isotope ratios in relation to paleodietary reconstruction. *Nature*. 317, 806-809.
- Dupras, T., Schwarcz, H. & Fairgrieve, S. (2001). Infant feeding and weaning practices in Roman Egypt. *American Journal of Physical Anthropology*. 115, 204-212.
- Fjellström, M. (2011). *Stable isotope analysis and ethical issues surrounding a human skeleton material from Rounala in Karesuando parish*. Tese de Mestrado Laboratório de Pesquisa Arqueológica - Universidade de Estocolmo, Estocolmo.
- Fry, B. (2006) *Stable Isotope Ecology*, Springer, Los Angeles.
- Fuller, B., De Cupere, B., Marinova, E., van Neer, W., Waelkens, M. & Richards, M. (2012). Isotopic Reconstruction of Human Diet and Animal Husbandry Practices During the Classical-Hellenistic, Imperial, and Byzantine Periods at Sagalassos, Turkey. *American Journal of Physical Anthropology*. 149, 157-171.
- Fuller, B. T., Molleson, T. I., Harris, D. A., Gilmour, L. T. & Hedges, R. E. M. (2006). Isotopic evidence for breastfeeding and possible adult dietary differences from Late/Sub-Roman Britain. *American Journal of Physical Anthropology*. 129, 45-54.
- IGESPAR. (2011) Ruínas do Convento de São Cucufate, Instituto de Gestão do Património Arquitectónico e Arqueológico, Lisboa.
- Janeiro, A. I. (2008). *Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas*. Tese de Doutoramento em Química Analítica. Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica - Universidade de Lisboa, Lisboa.

- Jorkov, M., Heinerneier, J. & Lynnerup, N. (2007). Evaluating bone collagen extraction methods for stable isotope analysis in dietary studies. *Journal of Archaeological Science*. 34, 1824-1829.
- Jorkov, M., Jorgensen, L. & Lynnerup, N. (2010). Uniform Diet in a Diverse Society. Revealing New Dietary Evidence of the Danish Roman Iron Age Based on Stable Isotope Analysis. *American Journal of Physical Anthropology*. 143, 523-533.
- Keenleyside, A., Schwarcz, H., Stirling, L. & Ben Lazreg, N. (2009). Stable isotopic evidence for diet in a Roman and Late Roman population from Leptiminus, Tunisia. *Journal of Archaeological Science*. 36, 51-63.
- Killgrove, K. & Tykot, R. (2013). Food for Rome: A stable isotope investigation of diet in the Imperial period (1st-3rd centuries AD). *Journal of Anthropological Archaeology*. 32, 28-38.
- Knipper, C., Peters, D., Meyer, C., Maurer, A.-F., Muhl, A., Schöne, B. & Alt, K. (2013). Dietary reconstruction in Migration Period Central Germany: a carbon and nitrogen isotope study. *Archaeological and Anthropological Sciences*. 5, 17-35.
- Knudson, K., Aufderheide, A. & Buikstra, J. (2007). Seasonality and paleodiet in the Chiribaya polity of southern Peru. *Journal of Archaeological Science*. 34, 451-462.
- Labconco (2004) *A Guide To Freeze Drying for the Laboratory*, Labconco Corporation, Kansas City.
- Lee-Thorp, J. (2008). On Isotopes and Old Bones. *Archaeometry*. 50, 925-950.
- Liden, K., Takahashi, C. & Nelson, D. (1995). The Effects of Lipids in Stable Carbon Isotope Analysis and the Effects of NaOH Treatment on the Composition of Extracted Bone-Collagen. *Journal of Archaeological Science*. 22, 321-326.
- Muccio, Z. & Jackson, G. (2009). Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*. 134, 213-222.
- Müldner, G., Chenery, C. & Eckardt, H. (2011). The 'Headless Romans': multi-isotope investigations of an unusual burial ground from Roman Britain. *Journal of Archaeological Science*. 38, 280-290.

- Müldner, G. & Richards, M. P. (2007). Stable isotope evidence for 1500 years of human diet at the city of York, UK. *American Journal of Physical Anthropology*. 133, 682-697.
- München, G. (2007). *Using ¹³C-, ¹⁵N- and ¹⁸O stable isotope analysis of human bone tissue to identify transhumance, high altitude habitation and reconstruct palaeodiet for the early medieval Alpine population at Volders, Austria*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Biologia - Universidade de Munique Ludwig-Maximilians, Munique.
- Nelson, D. & Cox, M. (2004) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4^a ed.
- O'Connell, T. C. (1996) *The Isotopic Relationship Between Diet and Body Proteins: Implications for the Study of Diet in Archaeology*, University of Oxford.
- O'Conner, T. (2000) *The archaeology of animal bones*, Sutton Publishing.
- Pollard, A., Ditchfield, P., McCullagh, J., Allen, T., Gibson, M., Boston, C., Clough, S., Marquez-Grant, N. & Nicholson, R. (2011). "These Boots Were Made For Walking": The Isotopic Analysis of a C₄ Roman Inhumation From Gravesend, Kent, UK. *American Journal of Physical Anthropology*. 146, 446-456.
- Prowse, T., Schwarcz, H. P., Saunders, S., Macchiarelli, R. & Bondioli, L. (2004). Isotopic paleodiet studies of skeletons from the Imperial Roman-age cemetery of Isola Sacra, Rome, Italy. *Journal of Archaeological Science*. 31, 259-272.
- Prowse, T. L., Schwarcz, H. P., Saunders, S. R., Macchiarelli, R. & Bondioli, L. (2005). Isotopic evidence for age-related variation in diet from Isola Sacra, Italy. *American Journal of Physical Anthropology*. 128, 2-13.
- Quintas, A., Freire, A. & Halpern, M. (2008) *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*, Lidel.
- Rand, A. (2011). *Ancient Maya Diet at Caledonia, Cayo District, Belize: The Isotope Evidence*. Tese de Mestrado em Artes. Faculdade de Artes e Ciência - Universidade de Trent, Peterborough.

- Rand, A., Healy, P. & Awe, J. (2013). Stable Isotopic Evidence of Ancient Maya Diet at Caledonia, Cayo District, Belize. *International Journal of Osteoarchaeology*. n/a-n/a.
- Redfern, R., Hamlin, C. & Athfield, N. (2010). Temporal changes in diet: a stable isotope analysis of late Iron Age and Roman Dorset, Britain. *Journal of Archaeological Science*. 37, 1149-1160.
- Redfern, R., Millard, A. & Hamlin, C. (2012). A regional investigation of subadult dietary patterns and health in late Iron Age and Roman Dorset, England. *Journal of Archaeological Science*. 39, 1249-1259.
- Rutgers, L., van Strydonck, M., Boudin, M. & van der Linde, C. (2009). Stable isotope data from the early Christian catacombs of ancient Rome: new insights into the dietary habits of Rome's early Christians. *Journal of Archaeological Science*. 36, 1127-1134.
- Salesse, K., Dufour, E., Castex, D., Velemínský, P., Santos, F., Kucharová, H., Jun, L. & Bruzek, J. (2013). Life history of the individuals buried in the St. Benedict Cemetery (Prague, 15th-18th Centuries): Insights from ^{14}C dating and stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$) analysis. *American Journal of Physical Anthropology*. 151, 202-214.
- Schoeninger, M. & Moore, K. (1992). Bone Stable Isotope Studies in Archaeology. *Journal of World Prehistory*. 6, 247-296.
- Sealy, J., Johnson, M., Richards, M. & Nehlich, O. (2014). Comparison of two methods of extracting bone collagen for stable carbon and nitrogen isotope analysis: comparing whole bone demineralization with gelatinization and ultrafiltration. *Journal of Archaeological Science*. 47, 64-69.
- Smadja, E. (1992). Les villas de São Cucufate. Un essai de-décryptage économique : Les villas romaines de São Cucufate (Portugal), sous la direction de J. Alarcão, R. Etienne, F. Mayet, Mission archéologique française au Portugal, Institut d'archéologie de l'Université de Coimbra, 1990. *Dialogues d'histoire ancienne*. 390-397.

- Sponheimer, M., Cerling, T., Holland, H. & Turekian, K. (2014) 14.21 - Investigating Ancient Diets Using Stable Isotopes in Bioapatites, in *Treatise on Geochemistry (Second Edition)* 2ª ed., pp 341-355, Elsevier, Oxford.
- Stevens, R. E., Lightfoot, E., Allen, T. & Hedges, R. E. M. (2012). Palaeodiet at Eton College Rowing Course, Buckinghamshire: isotopic changes in human diet in the Neolithic, Bronze Age, Iron Age and Roman periods throughout the British Isles. *Archaeological and Anthropological Sciences*. 4, 167-184.
- Sulzman, E. (2007) Stable isotope chemistry and measurement: a primer, in *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science* (Michener, R. e Lajtha, K., Eds.) 2ª ed., p 566, Blackwell Publishing.
- Tafuri, M., Craig, O. & Canci, A. (2009). Stable Isotope Evidence for the Consumption of Millet and Other Plants in Bronze Age Italy. *American Journal of Physical Anthropology*. 139, 146-153.
- Thompson, A., Chaix, L. & Richards, M. (2008). Stable isotopes and diet at Ancient Kerma, Upper Nubia (Sudan). *Journal of Archaeological Science*. 35, 376-387.
- Turner, B., Zuckerman, M., Garofalo, E., Wilson, A., Kamenov, G., Hunt, D., Amgalantugs, T. & Frohlich, B. (2012). Diet and death in times of war: isotopic and osteological analysis of mummified human remains from southern Mongolia. *Journal of Archaeological Science*. 39, 3125-3140.
- Tykot, R. (2004). Stable isotopes and diet: You are what you eat. *Physics Methods in Archaeometry*. 154, 433-444.
- Tykot, R. H. (2006) Isotope Analyses and the Histories of Maize, in *Histories of Maize - Multidisciplinary Approaches to the Prehistory, Linguistics, Biogeography, Domestication, and Evolution of Maize* (Staller, J., Tykot, R. H. e Benz, B., Eds.), Academic Press.
- Umbelino, C. (2002) C & N Isotopic Analysis: Research Lab for Archaeology, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Umbelino, C. (2006). *Outros Sabores do Passado: As análises de oligoelementos e de isótopos estáveis na reconstituição da dieta das comunidades humanas do*

Mesolítico Final e do Neolítico Final/Calcolítico do território português. Tese de Doutoramento em Antropologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Antropologia - Universidade de Coimbra, Coimbra.

- Van Klinken, G. (1999). Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science*. 26, 687-695.
- Wolfram, M. (2011). *Uma síntese sobre a cristianização do mundo rural no sul da Lusitânia*. Tese de Doutoramento em História, na especialidade de Arqueologia. Faculdade de Letras, Departamento de História - Universidade de Lisboa, Lisboa. 140
- Yoder, C. (2012). Let them eat cake? Status-based differences in diet in medieval Denmark. *Journal of Archaeological Science*. 39, 1183-1193.

Sites Consultados:

- <http://www.igespar.pt/pt/patrimonio/pesquisa/geral/patrimonioimovel/detail/70270/> (consultado em 11-06-2014);
- <http://www.rhizobia.uevora.pt/straincollection.html> (consultado em 09/09/2014);
- <http://www.spc.int/oceanfish/en/ofpsection/ema/biological-research/74-trophic-dynamic/105-stomach-content-analyses> (consultado em 11/06/2014);
- http://www.viladefrades.pt/portal/v3.0/mod_texto.asp?pag=34335267622766558199701219 (consultado em 09/09/2014).

Anexos

Anexo I

Tabela I.1. – Informação antropológica dos restos osteológicos humanos recolhidos na *villa* romana do Monte da Cegonha (HMC).

Amostra	Referência	Sexo	Idade	Ossos	Patologias
HMC 1	CEG.SEP1.OSS 70	Masculino	Adulto	Fémur direito	Periostite
HMC 2	CEG.SEP1.OSS 71	Feminino	Jovem adulto	Fémur direito	-
HMC 3	CEG.SEP1.OSS 72	-	Não-adulto (5-5,5 anos)	Fémur direito	-
HMC 4	CEG.SEP1.OSS 73	-	Não-adulto (3-3,5 anos)	Fémur direito	-
HMC 5	CEG.SEP1.OSS 74	-	Não-adulto (~6 meses)	Fémur direito	-
HMC 6	CEG.SEP2.11.2	Feminino	Jovem adulto (<27 anos)	Fémur esquerdo	-
HMC 7	CEG.SEP4.15.1	Feminino	Jovem adulto (<27 anos)	Fémur direito	-
HMC 8	CEG.SEP5.72	Feminino	Adulto (~40 anos)	Úmero esquerdo	-
HMC 9	CEG.SEP5.OSS 97	Indeterminado	Adulto	Fémur direito	-
HMC 10	CEG.SEP5.OSS 98	Indeterminado	Adulto	Fémur direito	-
HMC 11	CEG.SEP6.12.2	Masculino	Adulto	Fémur esquerdo	Osteoartrite
HMC 12	CEG.SEP6.OSS 76	Masculino	Adulto	Fémur esquerdo	-
HMC 13	CEG.SEP7.14.1	Feminino	Jovem adulto (<23 anos)	Fémur esquerdo	-
HMC 14	CEG.SEP7.OSS 140	Masculino	Jovem adulto	Fémur direito	Osteoma
HMC 15	CEG.SEP7.OSS 141	Masculino?	Adulto	Fémur direito	-
HMC 16	CEG.SEP8.OSS 98	-	Feto ou recém-nascido (38 semanas <i>in útero</i> ou 1,5 meses)	Úmero direito	-
HMC 17	CEG.SEP8.OSS 100	-	Não-adulto (6 meses – 1 ano)	Úmero esquerdo	-
HMC 18	CEG.SEP8.OSS 133	Masculino?	Adulto	Fémur esquerdo	Osteoartrite
HMC 19	CEG.SEP8.OSS 134	Indeterminado	Adulto	Fémur esquerdo	-
HMC 20	CEG.SEP8.OSS 135	Indeterminado	Indeterminado	Fémur	-
HMC 21	CEG.SEP9.OSS 87	Masculino	Jovem adulto	Fémur esquerdo	-
HMC 22	CEG.SEP9.OSS 88	Masculino	Adulto	Fémur esquerdo	-
HMC 23	CEG.SEP9.OSS 89	Indeterminado	Adulto	Fémur esquerdo	-
HMC 24	CEG.SEP9.OSS 90	Indeterminado	Adulto	Fémur esquerdo	Artrose
HMC 25	CEG.SEP9.OSS 253	Indeterminado	Adulto	Fémur esquerdo	-

Tabela I.2. – Informação antropológica dos restos osteológicos faunísticos recolhidos na *villa* romana do Monte da Cegonha (FMC).

Amostra	Referência	Taxonomia	Idade	Ossos
FMC 1	CEG AM 1	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Adulto	Falange proximal
FMC 2	CEG AM 2	<i>Cervus elaphus</i> (veado)	Adulto	Tíbia direita
FMC 3	CEG AM 3	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Adulto	Metacarpo
FMC 4	CEG AM 4	<i>Ovis aries/Capra hircus</i> (ovelha ou cabra)	Adulto	Úmero esquerdo
FMC 5	CEG AM 5	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Adulto	Rádio direito
FMC 6	CEG AM 6	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (3-4 anos)	Mandíbula esquerda
FMC 7	CEG AM 7	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (2-3 anos)	Mandíbula esquerda
FMC 8	CEG AM 8	<i>Ovis aries/Capra hircus</i> (ovelha ou cabra)	Adulto (1-2 anos)	Mandíbula esquerda
FMC 9	CEG AM 9	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Jovem adulto (~ 12meses)	Mandíbula direita
FMC 10	CEG AM 10	<i>Ovis aries/Capra hircus</i> (ovelha ou cabra)	Jovem adulto (<12 meses)	Mandíbula direita
FMC 11	CEG AM 11	<i>Ovis aries/Capra hircus</i> (ovelha ou cabra)	Adulto (>1 ano e meio)	Tíbia direita
FMC 12	CEG AM 12	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Adulto	Astrágalo esquerdo
FMC 13	CEG AM 13	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Adulto	Mandíbula direita
FMC 14	CEG AM 14	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (6-8 anos)	Mandíbula direita
FMC 15	CEG AM 15	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (>2 anos)	Mandíbula esquerda
FMC 16	CEG AM 16	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Adulto	Maxilar direito
FMC 17	CEG AM 17	<i>Ovis aries/Capra hircus</i> (ovelha ou cabra)	Adulto	Pelvis esquerda
FMC 18	CEG AM 18	<i>Sus sp.</i> (porco)	Jovem adulto (1-2 anos)	4º metacarpo direito
FMC 19	CEG AM 19	<i>Bos taurus</i> (bovino)	Adulto	Astrágalo esquerdo
FMC 20	CEG AM 20	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Juvenil (6-12 meses)	Mandíbula esquerda
FMC 21	CEG AM 21	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho)	Adulto	Mandíbula esquerda

Tabela I.3. – Informação antropológica dos restos osteológicos faunísticos recolhidos na *villa* romana de São Cucufate (HSC).

Amostra	Referência	Sexo	Idade	Ossos	Patologias
HSC 1	CUC/82 XXIV.32.18	Feminino	Adulto (30-34 anos)	Fémur direito	Exostose
HSC 2	CUC/82 XXIV.32.21	Indeterminado	Adulto	Tíbia direita	Osteoartrite
HSC 3	CUC/86 S4.T2.16	Masculino	Adulto (40-44 anos)	Fémur esquerdo	Osteoartrite
HSC 4	CUC/86 S4.T4.16	Feminino	Adulto (35-44 anos)	Fémur esquerdo	Osteoartrite
HSC 5	CUC/86 S.3 (1).11	Feminino	Adulto (35-39 anos)	Fémur esquerdo	Osteoartrite
HSC 6	CUC/01 Sep. 1 Esq. 1.11	Feminino	Jovem adulto	Fémur direito	-
HSC 7	CUC/01 Sep. 1 Esq.2.21	Feminino	Adulto	Fémur esquerdo	Osteoartrite
HSC 8	CUC/01 Sep. 1 Oss. 21	-	Não-adulto	Fémur	-
HSC 9	CUC/01 Sep. 1 Oss. 28	Indeterminado	Adulto	Tíbia esquerda	-
HSC 10	Sem referência	Indeterminado	Adulto	Fémur direito	-
HSC 11	CUC. 14	-	Não-adulto (18 ± 6 meses)	Fémur direito	-
HSC 12	CUC. 37	Feminino	Adulto (40-44 anos)	Fémur esquerdo	-
HSC 13	CUC. 39	Feminino	Adulto	Fémur esquerdo	-

Tabela I.4. – Informação antropológica dos restos osteológicos faunísticos recolhidos na *villa* romana de São Cucufate (FSC).

Amostra	Referência	Taxonomia	Idade	Osso
FSC 1	CUC AM 2	<i>Cervus elaphus</i> (veado)	Adulto	Astrágalo esquerdo
FSC 2	CUC AM 3	<i>Canis familiaris</i> (cão)	Jovem adulto (<15 meses)	Úmero direito
FSC 3	CUC AM 6	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (2-3 anos)	Mandíbula esquerda
FSC 4	CUC AM 7	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto	Mandíbula direita
FSC 5	CUC AM 8	<i>Sus sp.</i> (porco)	Adulto (>1 ano)	Úmero direito
FSC 6	CUC AM 10	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (>10 meses)	Úmero esquerdo
FSC 7	CUC AM 11	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (>10 meses)	Úmero direito
FSC 8	CUC AM 12	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Jovem adulto (10-36 meses)	Rádio direito
FSC 9	CUC AM 13	<i>Canis familiaris</i> (cão)	Jovem adulto (<1 ano e meio)	Fémur direito
FSC 10	CUC AM 14	<i>Canis familiaris</i> (cão)	Jovem adulto (<1 ano e meio)	Fémur esquerdo
FSC 11	CUC AM 18	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (3-4 anos)	Mandíbula direita
FSC 12	CUC AM 19	<i>Capra hircus</i> (cabra)	Adulto (3-4 anos)	Mandíbula esquerda
FSC 13	CUC AM 20	<i>Capra hircus/Ovis aries</i> (ovelha ou cabra)	Adulto (4-6 anos)	Mandíbula esquerda
FSC 14	CUC AM 21	<i>Capra hircus/Ovis aries</i> (ovelha ou cabra)	Adulto (4-6 anos)	Mandíbula direita
FSC 15	CUC AM 22	<i>Capra hircus/Ovis aries</i> (ovelha ou cabra)	Adulto	Maxilar direito
FSC 16	CUC AM 23	<i>Capra hircus/Ovis aries</i> (ovelha ou cabra)	Adulto	Maxilar esquerdo
FSC 17	CUC AM 24	<i>Canis familiaris</i> (cão)	Adulto (>13 meses)	Calcâneo direito
FSC 18	CUC AM 25	<i>Cervus elaphus</i> (veado)	Adulto	Escápula esquerda
FSC 19	CUC AM 26	<i>Canis familiaris</i> (cão)	Adulto (>6 meses)	Escápula direita

Anexo II

Tabela II.1. – Tabela ANOVA dos métodos de otimização da extração de colagénio.

		Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95%)
$\delta^{13}\text{C}$	Entre grupos	0,590	6	0,098	1,299	0,301
	Dentro dos grupos	1,591	21	0,076	-	-
	Total	2,181	27	-	-	-
$\delta^{15}\text{N}$	Entre grupos	1,181	6	0,197	2,116	0,094
	Dentro dos grupos	1,953	21	0,093	-	-
	Total	3,134	27	-	-	-

Tabela II.2. – Teste de Mann-Whitney para as diferenças entre indivíduos não-adultos e indivíduos jovens adultos e adultos da *villa* romana do Monte da Cegonha.

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Mann-Whitney U	39,000	33,000
Wilcoxon W	175,000	169,000
Z	-0,083	-0,578
Sig. assim.	0,934	0,563
Sig. exato	0,968	0,603

Tabela II.3. – Teste de Mann-Whitney para as diferenças entre indivíduos jovens adultos e adultos da *villa* romana do Monte da Cegonha.

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Mann-Whitney U	29,000	9,000
Wilcoxon W	50,000	64,000
Z	-0,109	-2,279
Sig. assim.	0,913	0,023
Sig. exato	0,958	0,022

Tabela II.4. – Teste de Mann-Whitney para as diferenças entre indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino da *villa* romana do Monte da Cegonha.

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Mann-Whitney U	11,000	6,000
Wilcoxon W	32,000	27,000
Z	-0,734	-1,643
Sig, assim.	0,463	0,100
Sig. exato	0,537	0,126

Tabela II.5. – Teste de Mann-Whitney para as diferenças entre indivíduos da *villa* romana do Monte da Cegonha e indivíduos da *villa* romana de São Cucufate.

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Mann-Whitney U	31,500	48,000
Wilcoxon W	86,500	103,000
Z	-3,193	-2,521
Sig, assim.	0,001	0,012
Sig. exato	0,001	0,011

Tabela II.6. – Teste de Mann-Whitney para as diferenças entre os herbívoros da *villa* romana do Monte da Cegonha e os herbívoros da *villa* romana de São Cucufate.

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Mann-Whitney U	91,500	17,000
Wilcoxon W	227,500	108,000
Z	-0,548	-3,816
Sig, assim.	0,583	0,000
Sig. exato	0,589	0,000