

Novo método de extração de amidos do cálculo dentário e criação de uma coleção identificada para a reconstrução das dietas do passado

A new method of starch extraction from dental calculus and creation of an identified collection for the reconstruction of paleodiets



Álvaro M. Monge Calleja^{1,2a*}, Ana Luísa Santos^{1,2,3b},
António Pereira Coutinho^{3c}

Abstract The identification of vegetable starches embedded in dental calculus has been potentiating the study of paleodiets. This study describes a new protocol for extraction and identification of vegetable starches and discloses the creation of an identified collection for their subsequent identification. The extraction protocol consists in a three-stage procedure, with a duration of four days. The dental calculus is subjected to a slight acidic dissolution of its phosphocalcic matrix, to the precipitation of the starches and to the morphometric identification under optic and/or electron microscopy. The identification of starch grains depends on the comparison of their morphometric characteristics. To this end, a reference collection was created, based on usual fresh, dry and powdered foods

Resumo A identificação de amidos vegetais embebidos no cálculo dentário tem vindo a potenciar o estudo das dietas do passado. Este trabalho apresenta um novo protocolo de extração e identificação de amidos vegetais e divulga a criação de uma coleção identificada para a subsequente identificação. O protocolo consta de três fases — extração, preparação e identificação —, com uma duração de quatro dias, em que o cálculo dentário é sujeito à dissolução ácida ligeira da matriz fosfocálcica, à precipitação dos amidos, e à observação e identificação morfológica através de microscopia ótica e/ou eletrónica. Para tal, foi criada uma coleção identificada, a partir de alimentos — frescos, secos ou em farinha — habituais na dieta no território português. Adicionou-se uma chave dicotómica de consulta rápida

¹ CIAS — Centro de Investigação em Antropologia e Saúde, Universidade de Coimbra

² Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra

³ CFE — Centro de Ecologia Funcional, Universidade de Coimbra

^a orcid.org/0000-0002-3345-5082, ^b orcid.org/0000-0001-6073-1532; ^c orcid.org/0000-0002-5371-6411

* Autor correspondente/Corresponding author: manu_alvaro16@hotmail.com

common in the diet in the Portuguese territory. A dichotomous identification key has been added to facilitate the process of identification. To date, the collection has 19 species, although it is expected to increase in response to new research projects. We hope that future studies will benefit from this methodology for the reconstruction of the diets of the past.

Keywords: Polysaccharides; tartar; protocol; vegetable food; microscopy; dichotomous key.

Introdução

O estudo de amidos vegetais para a reconstrução alimentar das populações do passado adquiriu, recentemente, uma grande importância como ferramenta complementar à análise de isótopos estáveis e à avaliação do microdesgaste dentário (Fiorenza et al., 2015; Power et al., 2015). Os grânulos de amido são macromoléculas polissacarídicas localizadas nos plastídios vegetais e formadas por dois polímeros de glucose: amilose e amilopectina (Loy, 1994; Hardy et al., 2009). Formam-se a partir dum ponto de nucleação ou hilo e crescem em camadas concêntricas (Loy, 1994) cuja morfologia varia geneticamente entre famílias, géneros e espécies (Aceituno Bocanegra e López Sáez, 2012). Por esse motivo, é possível realizar classificações taxonómicas baseadas na sua caracterização morfométrica (estrutura, tamanho, forma, tipo de bordo, tipo de

para facilitar o processo de identificação do amido. Esta coleção conta com 19 espécies, estando prevista a sua ampliação caso surjam novos projetos de investigação. Esperamos que no futuro os estudos beneficiem desta metodologia para a reconstrução das dietas do passado.

Palavras-chave: Polissacáridos; tártaro; protocolo; alimentação vegetal; microscopia; chave dicotómica.

hilo) e ótica (cruz de polarização ou Cruz de Malta¹) específicas.

Os grãos de amido armazenam-se preferencialmente em estruturas vegetais subterrâneas, como os bolbos, os tubérculos, as raízes ou as sementes (Guismondi et al., 2018); motivo pelo qual os tubérculos, os cereais e as leguminosas — batata, arroz, lentilha, entre outros —, estão no topo dos alimentos amiláceos. As frutas, com exceção da banana, apresentam uma menor concentração de grânulos de amidos, mas, de acordo com a *American Diabetes Association* (s. d.), várias espécies — nomeadamente a abóbora, a acelga, o aipo, a alcachofra, a alface (e outras folhas de salada), o alho francês, a beterraba, os brócolos, a ce-

¹ A Cruz de polarização ou Cruz de Malta é um efeito ótico provocado pela organização perpendicular das moléculas de amilose e amilopectina à passagem da luz, também conhecido como birrefringência (Vásquez Sánchez e Rosales Tham, 2007).

bola, a cenoura, a couve-de-bruxelas, a couve-flor, os espargos, os espinafres, o feijão-verde, o pepino, o pimento, o repolho, o tomate, etc. — possuem quantidades de amido mínimas. Estes vegetais não-amídicos (*non-starchy*) armazenam, preferentemente, os hidratos de carbono em forma de fibras (Antia et al., 2006), como a lenhina, a celulose e a hemicelulose (Anderson et al., 2009), insolúveis e não digeríveis pela flora intestinal (Martin, 2016). Os produtos processados de vegetais, como o pão, também contêm amidos passíveis de categorização taxonómica.

A quantificação e identificação de amidos para estudos de índole antropológica pode realizar-se através da análise sedimentar ou de esfregaços realizados em potes cerâmicos e ferramentas pétreas destinadas ao consumo de alimentos (ver Henry e Piperno, 2008; Hardy et al., 2009), entre outros. No entanto, nos últimos anos, o foco científico e bibliográfico tem privilegiado o tártaro ou cálculo dentário (CD) (Boyadjian, 2012; Power et al., 2015), definido como o depósito fosfocálcico, localizado sobre as superfícies dentárias supra e/ou subgingivais (Hillson, 1996; Radini et al., 2016), formado através da mineralização da placa oral pela precipitação dos elementos inorgânicos dissolvidos na saliva (Lieverse, 1999; Buckley et al., 2014). Durante este processo, outros elementos derivados do processamento alimentar e/ou da própria atividade microbiana podem ficar retidos na matriz do

tártaro (Jin e Yip, 2002). A saliva tem um papel multifatorial, atuando como lubrificante oral perante abrasões, facilitando a digestão alimentar ou inibindo o efeito de resíduos nocivos para o ambiente bucal (Stookey, 2008). Ao revestir as superfícies bucais, a saliva serve de substrato orgânico para o microbioma oral, composto por uma complexa infinidade de microrganismos: bactérias, vírus, protozoários, fungos e arqueias (ver Wade, 2013). Estes microrganismos alocados nas porções interdentárias tendem a metabolizar as proteínas, enquanto os localizados no resto da cavidade oral são, predominantemente, sacarolíticos (Radini et al., 2016). Assim, em função da biodisponibilidade dos elementos ingeridos, ativar-se-ão vias metabólicas com repercussões sobre o pH bucal (Margolis, 1990; Radini et al., 2016) e o desenvolvimento de CD e cáries, entre outros eventos (ver Hillson, 2005).

A formação do CD e de cáries depende de processos bioquímicos antagónicos que desequilibram o pH neutro (ao redor de 6 ou 7) da saliva (Keyes e Rams, 2016), tal como descrito pela Curva de Stephan (Bowen, 2013). Perante dietas ricas em proteínas e hidratos de carbono não fermentáveis (Humphrey et al., 2014), o pH bucal basifica, ao desencadear-se uma eliminação de elementos ácidos (H^+ e CO_2) paralela ao aumento de amónia e ureia (Margolis, 1990; Radini et al., 2016), o que facilita um gradiente iónico de cálcio e fósforo da saliva para a placa oral (Pedersen e Belstrøm, 2019),

fomentando a deposição do CD (Dawes, 2006; Radini et al., 2016). Contrariamente, quando o ambiente oral acidifica (<5), após a fermentação da sacarose em ácido láctico e acético (Dawes, 2006; Bowen, 2013), exerce uma dissolução, primeiro dos depósitos de CD, se existirem, ou das estruturas dentárias, induzindo o aparecimento de cáries (Hillson, 2005). Infelizmente, este processo não é linear, dado que o fluxo salival, a colonização microbiana, a deposição de CD e a distribuição de açúcares fermentáveis não são homogêneos na cavidade oral, ao dependerem do tamanho e do fluxo de escoamento das glândulas salivais e da velocidade de deposição do biofilme microbiano, o qual, por sua vez, é diretamente proporcional à película salival que recobre o(s) dente(s) (Dawes, 2006; Hassan, 2018). Assim, tendencialmente, o CD deposita-se na face lingual dos incisivos inferiores e nas faces bucais dos primeiros molares superiores (Dawes, 2006; 2008). Por estes motivos, Lieverse (1999) sugeriu que o aparecimento de CD e de cáries deve estar associado a outros aspetos além dos constituintes macromoleculares da dieta, nomeadamente o consumo inadequado de fluoreto (Hassan, 2018), cálcio, fósforo, bicarbonato, etc. (Lieverse et al., 2007). No entanto, não existe um consenso sobre o contributo desta longa lista de fatores que influenciam a formação do CD, aos quais se deve adicionar ainda outros extra-alimentares, de cariz biocultural, nomeadamente a idade, o sexo e a predis-

posição genética — formadores lentos ou rápidos de tártaro — (Fons-Badal et al., 2020), a presença de certas patologias (Lieverse, 1999; Hardy et al., 2009) ou a higiene oral dos indivíduos (Buckley et al., 2014; Radini et al., 2016).

Os primórdios do estudo do CD, como recetáculo de informação bioarqueológica, remontam aos trabalhos realizados pelo zoólogo inglês Philip L. Armitage, que, em 1975, caracterizou os fitólitos embebidos no CD de espécies ganadeiras de várias épocas. Posteriormente, Dobney e Brothwell, em 1988, analisaram amostras dentárias humanas, aplicando microscopia de varrimento, ratificando o valor destes estudos como determinante na ecologia alimentar da espécie humana (Power et al., 2014). Desde então saíram inúmeras publicações, quer sobre as características particulares de cada espécie vegetal e/ou zona geográfica, quer como contributo do estudo paleobiológico humano. Boa parte da importância investida neste tipo de estudos radica na dependência constante dos alimentos amiláceos na dieta pré e pós-agrícola (Atkins e Bowler, 2001; Weiss et al., 2004; Aura et al., 2005; Hardy, 2007; Barton e Torrence, 2015), os quais, mesmo na atualidade (p. ex., arroz, trigo, milho, batata, etc.), são mundial e frequentemente consumidos (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, 2019). Nas palavras de Soto e colaboradores, este tipo de estudos fornece uma excelente linha de investigação, aprofundando a «ecologia humana, nas práticas culinárias,

na saúde (vegetais com propriedades terapêuticas) e na genómica» (2019: 4848).

A reconstrução da dieta das comunidades humanas do passado a partir dos amidos vegetais retidos no CD inicia-se com a sua extração da matriz fosfocálcica. Vários protocolos foram publicados nos últimos anos (Han e Hamaker, 2002; Torrence e Barton, 2006; Henry e Piperno, 2008; Hardy et al., 2009; Charlier et al., 2010; Power et al., 2014; Pagán-Jiménez et al., 2015; Tromp e Dudgeon, 2015, adaptado de Hardy et al., 2009) cuja implementação é complexa, dispendiosa e recorre a reagentes agressivos. Simultaneamente, a classificação taxonómica dos amidos vegetais deve realizar-se através do confronto com coleções identificadas, como as criadas na Universidade de Cambridge com espécies vegetais procedentes dos Balcãs, ou a da Universidade de York, que abrange plantas do Norte e Sul da Europa, assim como do Norte de África (ver Cristiani et al., 2016; 2018). Não obstante, o único atlas de comparação encontrado pelos autores destina-se exclusivamente a espécies neotropicais (Pagán-Jiménez, 2015), pelo que não constam espécies cultivadas de climas temperados como as da Península Ibérica. Paralelamente, outros estudos como o de Guismondi e colaboradores (2018), apresentam longas listagens de características morfométricas para produtos vegetais temperados, mas carecem de informação micrográfica complementar. Em Portugal, realizaram-se vários estudos de cariz descritivo e de quantificação bioquímica para espécies

nativas (p.ex., Correia et al., 2012; Silva et al., 2015, entre outros), mas carecem de abordagens antropológicas que recorram a esta ferramenta analítica.

Com o objetivo de preencher esta lacuna, e acreditando no benefício deste tipo de abordagem como ferramenta auxiliar na avaliação das dietas no passado, este trabalho tem como objetivos descrever um novo protocolo de extração de amidos vegetais retidos no cálculo dentário e apresentar a coleção identificada com uma chave dicotómica de fácil aplicação, criada com base na alimentação portuguesa.

Protocolo de extração de amidos do cálculo dentário

O CD é um material de fácil destruição durante a escavação, transporte, limpeza e manipulação laboratorial dos crânios ou dentes (Barton e Torrence, 2015). Com efeito, recomenda-se a prévia fotografia dos depósitos *in situ*, pois a amostragem dos amidos é um processo destrutivo, pela recolha duma pequena quantidade (cerca de 2–4 mm²). De forma opcional, antes do processamento da amostra recolhida, é aconselhável o estudo do(s) fragmento(s) de CD com Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV), para a eventual identificação de vestígios biológicos mineralizados aderentes (p. ex., pólenes, fibras, diatomáceas, quistos de crisofíceas, espículas de esponjas e partículas mineiras, entre outras [ver Boyadjian, 2012]). Esta sugestão abrange, também, os casos

de rutura accidental da(s) amostra(s) de cálculo que permitem a observação adicional da superfície interna (de contacto com o dente) do fragmento em estudo.

O procedimento laboratorial criado no Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra para a obtenção de grãos de amido procedentes do CD resulta de ensaios realizados em indivíduos adultos que viveram nos séculos XIV–XIX (ver Pereira et al., 2017) e consta de três fases principais (Figura 1).

Extração dos grânulos de amido

Antes de se descreverem os procedimentos laboratoriais, convém salientar alguns pormenores relativos à contaminação do CD, uma questão pouco considerada nos protocolos publicados, mas imprescindível para evitar enviesamentos na quantificação e identificação dos amidos vegetais. Inicialmente, era considerado que, devido à interrupção da formação de CD com a morte dos indivíduos, a probabilidade de difusão de elementos alheios ao CD era mínima (Middleton e Rovner, 1994). Contudo, anos depois, foi confirmado que os amidos vegetais são ubíquos, podendo existir transmissões mediadas pelo ar, pela água, pelo sedimento ou por práticas puramente laboratoriais, como, por exemplo, o uso de luvas de látex revestidas com pó de milho (Laurence et al., 2011). Crowther e colaboradores (2014) avaliaram a eficácia de vários métodos para diminuir o risco de contaminação,

inclusive no decorrer da própria escavação. Entre estas metodologias salienta-se a vaporização com ar sobre pressão (Charlier et al., 2010), o bombardeamento com azoto (Tromp e Dudgeon, 2015), a irradiação ultravioleta, os tratamentos branqueadores com lixívia (Weyrich et al., 2015), ou a descontaminação a seco em ambiente estéril por escovagem suave (Power et al., 2014). Este último método foi o escolhido para ser aplicado no presente protocolo devido à sua maior acessibilidade e custo reduzido.

Realizada a escovagem, os fragmentos de CD selecionados para o estudo são dissolvidos numa preparação de ácido clorídrico 1N (1 ml de ácido clorídrico 37% em 9 ml de água destilada) durante quatro dias. No primeiro dia, coloca-se um crivo com malha de 0,3 mm de diâmetro sobre a abertura de um matraz e colocam-se 2–4 mm² do CD nas gotas da solução ácida. Tritura-se suavemente com uma vareta de aço (limpa com álcool entre utilizações para evitar a contaminação) até a totalidade da amostra se dissolver. Transfere-se a solução, por gotejamento, para um tubo Eppendorf de 1 ml e centrifuga-se a 9000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, o preparado é decantado em bloco (num único movimento, de modo a evitar a ressuspensão e subsequente perda do material) para eliminar possíveis impurezas retidas no sobrenadante e o tubo é enchido com mais solução ácida. Agita-se manualmente e deixa-se repousar à temperatura de 4 °C.

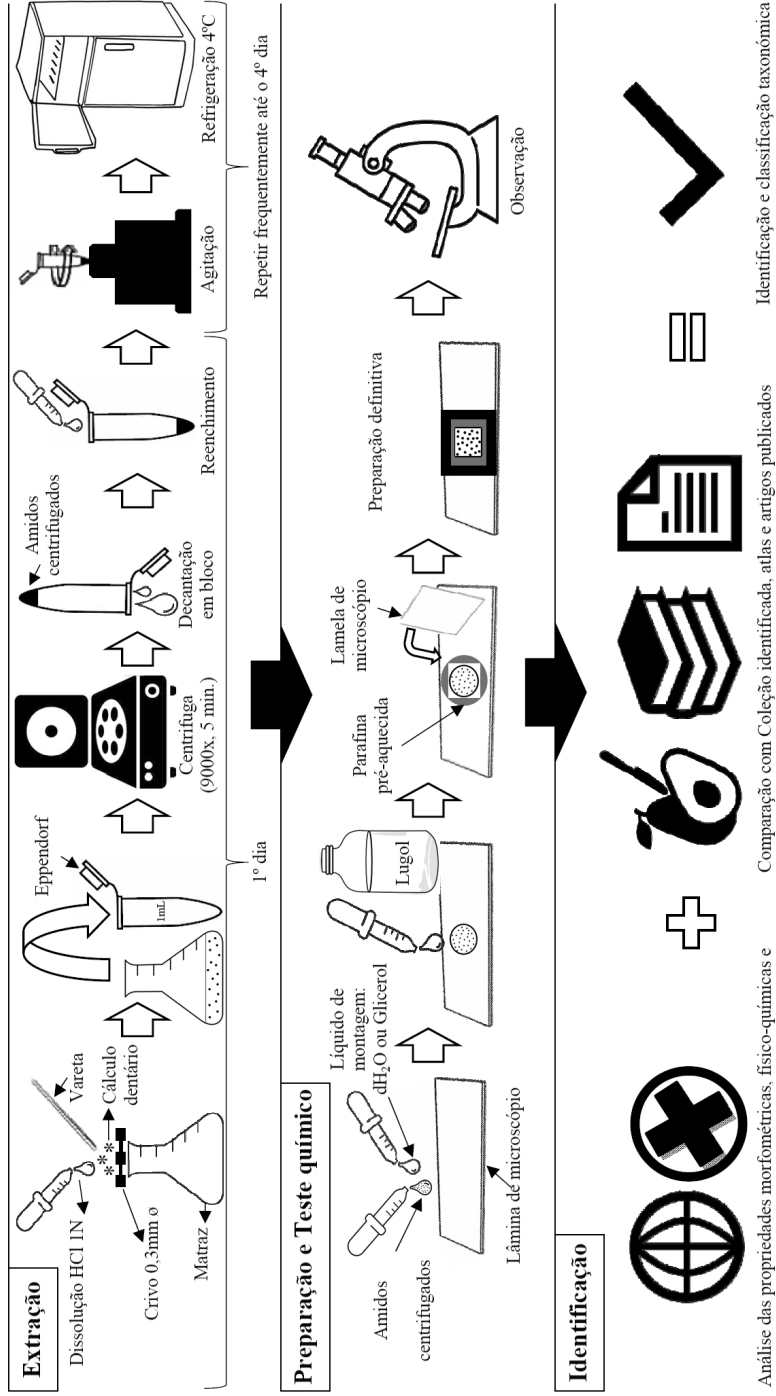


Figura 1. Esquema do procedimento laboratorial para extração, preparação e identificação de amidos vegetais retidos no cálculo dentário.

Durante o segundo e terceiro dia é conveniente a realização de várias agitações manuais para assegurar que a solução ácida entra em contacto com todo o carbonato do cálculo dentário. No quarto dia, verifica-se novamente o estado da solução para se iniciarem as restantes fases do protocolo.

No caso de ser necessário o armazenamento da preparação por mais de 4 dias, antes da realização das preparações definitivas, é conveniente centrifugar os Eppendorfs, decantar a solução ácida, encher com água destilada e manter no frigorífico a 4 °C para evitar possíveis degradações ácidas dos grânulos de amido. Preparação das amostras e teste químico

Preparação das amostras e teste químico

Extraídos os grânulos de amido, colocam-se duas gotas da solução sobre uma lâmina de microscópio. De seguida, acrescenta-se uma gota de glicerol (ou água destilada) e outra de soluto de Lugol para permitir uma visualização mais fidedigna dos amidos vegetais. Este composto consiste numa solução de iodo molecular (I_2 -1 g) e iodeto potássico (KI — 2 g) em água destilada (300 ml) que atua como marcador específico de polissacáridos complexos, como amidos, glicogénio ou certas dextrinas (Kutík e Benes, 1977). Mais especificamente, o Lugol reage com as cadeias de amilose do amido, permitindo que os iões de iodo se introduzam no interior das cadeias hidrocarbonadas; isto

cria um efeito ótico específico em que os polissacáridos complexos adquirem uma coloração azul escura, púrpura ou preta, consoante a concentração dos grânulos (Clerici et al., 2019).

Com o objetivo de realizar uma preparação microscópica permanente, o passo seguinte consiste em contornar a preparação com parafina pré-aquecida, colocando uma lamela de microscópio sobre as gotas de solução e deixando arrefecer a parafina, de modo a efetuar uma selagem apropriada.

Caso o/a investigador/a tenha acesso a microscopia eletrónica de varrimento, o teste químico (soluto de Lugol) e a preparação de amostras não serão necessários. Nesta situação, finalizada a extração, procede-se à decantação em bloco dos tubos Eppendorf e deixa-se secar a fase líquida da amostra à temperatura ambiente. Uma vez seco, tira-se uma pequena quantidade do precipitado (amidos centrifugados) e coloca-se sobre um porta-objetos previamente coberto com discos de carbono biadesivos. Para executar uma observação correta da amostra, é necessário recobri-la com um material condutor de eletrões — por exemplo, carbono, paládio, ouro, etc. — antes de se proceder à análise no microscópio eletrónico.

Identificação de amidos e a coleção identificada

Esta fase decorre pela comparação morfológica, externa e interna, e de cer-

tas propriedades óticas dos grânulos de amido (Tabela 1). Por esse motivo, foi necessário criar de novo uma coleção identificada de amidos vegetais, cujo ponto de partida fosse os alimentos de consumo mais frequente no território português desde a Pré-história ou que tenham sido introduzidos posteriormente na Península Ibérica. Segundo as fontes documentais, a alimentação portuguesa, à semelhança do que acontecia noutros pontos da geografia europeia, era: 1) assimétrica quanto às classes sociais (Ferreira, 2008; Vinhas, 2012); 2) monótona em função da escolha alimentar, da disponibilidade económica dos produtos e das frequentes crises frumentárias (Cascão, 2011); e 3) deficiente nutricionalmente, ao privilegiar os hidratos de carbono e as gorduras em vez de proteínas, vitaminas e minerais (Rodrigues, 2008). A origem, a dispersão e a cronologia da introdução no continente europeu e/ou na Península Ibérica das espécies vegetais selecionadas neste protocolo pode ser consultada na Tabela 2.

Através desta revisão, pode-se comprovar que a maioria dos cereais e dos legumes tem uma procedência Euroasiática (Crescente Fértil), coincidente com o período Neolítico, tendo vindo a maximizar-se a sua utilização na Península Ibérica de forma diferencial, dependendo dos povos e culturas: p. ex., romanos, visigodos, árabes, etc. De facto, o pilar fundamental da alimentação Peninsular, desde o período clássico até grande parte do século XX, era o pão, logo, o consumo

de amidos procedentes de cereais panificáveis, como o trigo, o milho, o centeio, a cevada ou a aveia, aos quais se somavam sucedâneos produzidos com base na castanha, na bolota e em certas leguminosas (Ferreira, 2008), designadamente nos locais orograficamente mais elevados e que não possuíam um clima adequado para o cultivo dos cereais (Peña-Chocarro et al., 2019). Relativamente ao milho (*Zea mays*), o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a batata (*Solanum tuberosum*) e a batata-doce (*Ipomoea batatas*), a sua origem remonta ao continente americano ou, inclusivamente, a vários pontos do Pacífico entre os séculos XV–XVII (Kiple e Ornelas, 2000). Finalmente, a amêndoa (*Prunus dulcis*) e o arroz (*Oryza sativa*) procedem do continente asiático, tendo sido datada a sua introdução na Península Ibérica nos séculos VII–VIII e XIII pela mão das comunidades fenícias (Pérez-Jordá et al., 2017) e árabes (Vaquinhas, 2005), respetivamente.

O consumo de legumes e fruta entre as classes médias-baixas predecessoras da transição nutricional — datada para Portugal a partir de 1974 (Bento et al., 2018) — é confuso entre quem defende a rica diversidade hortofrutícola portuguesa (p. ex., favas e feijões, ervilhas, lentilhas, grão-de-bico, chícharos, tremçoços, couves, alhos, cebolas, nabos, alfaces, cenouras, beringelas, rábanos, espinafres, etc.; e a presença de vinhas, figueiras, castanheiros, pereiras, macieiras, ameixoeiras, pessegueiros, nogueiras, amendoeiras, melão, etc.); e quem acredita na escassa

Tabela 1. Resumo das características morfométricas dos amidos vegetais (Adaptado de *The International Code for Starch Nomenclature* [ICSN, 2011] e Pagán-Jiménez, 2015).

VARIÁVEL		DEFINIÇÃO
Estrutura	<i>Simples</i>	Grânulos constituídos por um só corpo
	<i>Composta</i>	Junção de dois ou mais grânulos simples
Tamanho	Descrição métrica em comprimento, largura (2D) e ou diâmetro (3D) referida em micrómetros. Refere-se sempre a medida mínima e máxima.	
	<i>Bidimensional</i>	<p>Alongado: comprido, lanceolado</p> <p>Circular: com todos os raios do mesmo tamanho</p> <p>Poligonal: com mais de quatro lados</p> <p>Oval: com uma dimensão ligeiramente superior à outra</p> <p>Quadrado: com quatro lados iguais</p> <p>Retangular: com lados iguais dois a dois</p> <p>Semicircular: parcialmente circular</p> <p>Trapezoide: com quatro lados, dois paralelos</p> <p>Triangular: com três lados bem definidos</p>
Forma	<i>Bidimensional</i>	<p>Bicónico: com dois cones opostos, simétricos ou assimétricos</p> <p>Cilíndrico: com bases circulares</p> <p>Côncavo-convexo: extremos com angulação diferente</p> <p>Conoide: uma metade cônica e a outro ovoide ou hemisférica</p> <p>Discoide: plano e arredondado na vista planar.</p> <p>Elipsoide: ovoide com os dois extremos iguais</p> <p>Esférico: em forma de esfera</p>
	<i>Tridimensional</i>	<p>Forma de cunha: aplanado, engrossado num extremo</p> <p>Hemisférico: parcialmente esférico</p> <p>Lenticular: biconvexo</p> <p>Ovoide: com um extremo mais pequeno do que o outro</p> <p>Plano-convexo: plano num lado e convexo noutro</p> <p>Piriforme: em forma de pera</p> <p>Poliédrico: várias caras</p> <p>Quadrangular: seis lados</p> <p>Reniforme: com forma de rim</p>
Bordo	Características das linhas que delimitam os grânulos e que, nalguns casos podem apresentar facetas de pressão (depressões) com diferentes localizações e morfologias.	

Tabela 1. (cont.)

		VARIÁVEL	DEFINIÇÃO
Características externas	Hilo	<i>Alongado</i>	O eixo de maior diâmetro do grânulo é paralelo ao do hilo
		<i>Cêntrico/ excêntrico</i>	Localizado na posição central ou na periferia dos grânulos
		<i>Distinto/ indistinto</i>	Com melhor ou pior claridade
		<i>Esférico</i>	Redondo em três dimensões
		<i>Invisível</i>	Não aparente
		<i>Lenticular</i>	O eixo curto do grânulo é paralelo ao de maior diâmetro do hilo
		<i>Refratário</i>	Efeito ótico de mudança de cor de preto para branco em função do plano de focagem
	Cruz de Malta	<i>Cêntrico/ excêntrico</i>	Dentro ou fora do centro geométrico do grânulo
		<i>Distinto/ indistinto</i>	Com melhor ou pior claridade
		<i>Simétrico/ assimétrico</i>	Similaridade das componentes da cruz (braços)
		<i>Linhas grossas/ finas</i>	Largura dos braços
		<i>Linhas Retas/ curvadas</i>	Extensão ou flexão dos braços
		<i>Confusa</i>	Distorcida pela presença de fissuras
		<i>Desigual/preciso</i>	Irregulares e/ou dentadas
	<i>Número e comprimento dos braços</i>		

Tabela 2. Origem das espécies vegetais selecionadas no presente protocolo, segundo *The Cambridge world history of food* (Kiple e Ornelas, 2000) e a cronologia da sua introdução no continente europeu ou, caso se conheça, na Península Ibérica.

Família	Espécie	Origem	Introdução Europeia/Peninsular	Referência
	<i>Avena sativa</i> (aveia)	Crescente fértil (10 500–5000 a.C.)	Dispersão continental (sétimo–segundo milénio a.C.)	Peña-Chocarro et al. (2019)
	<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	Egito (~18000 a.C.); Egito; 2. ^a fase domesticação europeia no Neolítico inicial (~9200 a.C.)	Costa mediterrânica e Balcãs: bebidas e forragem animal	Peña-Chocarro et al. (2019)
	<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Egito/Israel (~16 000 a.C.); hibridação das espécies einkorn e Emmer	Rápida disseminação europeia. No Império romano era usado pelas suas propriedades panificáveis	Miller (1987), Balfourier et al. (2019)
Poaceae	<i>Panicum miliaceum</i> (milho-miúdo)	Próximo Oriente (~9000 a.C.)	Via Europa do Leste e Central (7000–5000 a.C.). Primeira evidência peninsular em <i>Castro de Palheiros</i> no 3.º milénio a.C.	Moreno-Larrazabal et al. (2015)
	<i>Secale cereale</i> (centeio)	Leste da Turquia-Iráo, Neolítico	Balcãs (~4400 a.C.). Rápida disseminação europeia. Império romano para produção de cerveja. Muito presente no norte da Península Ibérica	Hjelmqvist (1989), Behre (1992), Peña-Chocarro et al. (2019)
	<i>Zea mays</i> (milho)	Continente americano	Introduzido na Europa, Ásia e África durante os séculos XVI–XVII por espanhóis e portugueses	Kiple e Ornelas (2000)
	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	China(> 10000 a.C.) hibridação das espécies indica e japónica	Cultura introduzida pelo império árabe, com referências para o século XIII.	Vaquinhas (2005), Fuller et al. (2010)
Fabaceae	<i>Cicer arietinum</i> (grão-de-bico)	Crescente fértil (12– 10000 a.C.)	Rápida introdução na Europa e na Península Ibérica (Neolítico inicial)	Abbo et al. (2003), Redden e Berger (2007)
	<i>Lens esculenta</i> (lentilha)	Grécia (13000-9500 a.C.), Próximo Oriente (10 000–95000 a.C.)	Rápida introdução na Europa e na Península Ibérica (Neolítico inicial)	Peña-Chocarro et al. (2019)

Tabela 2. (cont.)

Família	Espécie	Origem	Introdução Europeia/Peninsular	Referência
	<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	Mesoamericana e Andina	Espécie mesoamericana introduzida em 1506 e andina em 1528 após colonização espanhola e portuguesa	Berglund-Brücher e Brücher (1976), Gepts (1988), Ron et al. (2016)
Fabaceae	<i>Pisum sativum</i> (ervilha)	Bacia mediterrânica, Norte de África, Médio Oriente (Neolítico) e Índia	Dispersão pela bacia do Mediterrâneo no Neolítico inicial e importante na época clássica	Peña-Chocarro et al. (2019)
	<i>Vicia faba</i> (fava)	Médio Oriente (Neolítico); forte domesticação na Bacia Mediterrânica entre os séculos IV e V a.C.	Neolítico inicial	Peña-Chocarro et al. (2019)
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i> (castanha)	Mioceno (15 milhões de anos.C.). Regiões montanhosas de difícil adaptação cerealífera	Espécie doce na Grécia (3000 a.C.), sistematização do seu consumo na Idade Média.	Coelho (2018)
Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i> (batata doce)	Polinésia e Melanésia pré-colombianas (8000–2000 a.C.); segundo foco: América, Ásia e África.	Trazida para a Europa por espanhóis em finais do séc. XV	Kiple e Ormelas (2000)
Musaceae	<i>Musa</i> sp. (banana)	Transição asiática (Malásia, Tailândia) para África, América Central e Caraíbas.	Alimentação de escravos, talvez tenha sido trazida por espanhóis através da rota das Filipinas no século XVI	Kiple e Ormelas (2000)
Rosaceae	<i>Prunus dulcis</i> (amêndoa)	Originária de Ásia Central (Irão e países vizinhos)	Introduzida na Península Ibérica pelos fenícios, entre os séculos VII e VIII a.C.	Pérez-Jordá et al. (2017)
Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i> (batata)	Americana (potes Incas); duas espécies: Peruana e Andina	Importação espanhola da espécie peruana em meados do séc. XVI; depois da crise da batata (1840) predominou a espécie andina. Portugal não tem registos da data de introdução.	Hawkes (1978; 1990), Sood et al. (2017)

disponibilidade económica para estes estamentos sociais (Ferreira, 2008; Gonçalves, 2011), unida a escolhas dietéticas que dispensassem maior energia relativamente ao trabalho extenuante que estes estamentos sociais realizavam (Cascão, 2011).

Coleção identificada

A coleção identificada de amidos compõe-se, até à data, de 19 espécies pertencentes a 6 famílias: *Poaceae* (n=7, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Panicum miliaceum*, *Secale cereale*, *Zea mays* e *Oryza sativa*), *Fagaceae* (n=1, *Castanea sativa*), *Fabaceae* (n=5, *Cicer arietinum*, *Lens esculenta*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Vicia fava*), *Convolvulaceae* (n=1, *Ipomoea batatas*), *Musaceae* (n=1, *Musa sp.*), *Rosaceae* (n=3, *Prunus dulcis*, *Malus domestica* e *Pyrus communis*) e *Solanaceae* (n=1, *Solanum tuberosum*). Duas espécies da família *Rosaceae* foram descartadas da caracterização morfométrica, a maçã (*Malus domestica* [Borkh]) e a pera (*Pyrus communis* L.), por se tratar de frutas com escasso conteúdo amídico, o que as torna pouco relevantes para estudos deste género. Os alimentos frescos (p. ex., frutas e hortaliças) e secos (p. ex., grãos dessecados) usados na coleção identificada foram partidos ao meio, a superfície interna foi raspada com um escalpelo e a polpa colocada na lâmina do microscópio ótico, numa gota de água destilada ou de glicerol. No caso das farinhas, é suficiente colocar uma pequena quantidade dire-

tamente na gota de água ou glicerol. Em ambos os casos, uma vez finalizado este procedimento, pode proceder-se à preparação das amostras como indicado no ponto de preparação das amostras e teste químico.

Quer os dados métricos — comprimento (C), largura (L) e rácio C/L (Tabela 3) —, quer os morfológicos — estrutura, forma, superfície, hilo e camadas de deposição (Tabela 4) — correspondem à mensuração de 340 grânulos de amido, isto é, 20 grânulos diferentes de cada uma das 17 espécies consideradas (excluída a maçã e a pera), que se encontram ilustradas nas Figuras 2A-Q. Para todos os efeitos, as descrições morfométricas realizadas neste protocolo sustentaram-se na nomenclatura proposta pela *International Code for Starch Nomenclature* (ICSN, 2011; ver Tabela 1). Conjuntamente, foi criada uma chave dicotómica simplificada, disponível no Anexo 1, como ferramenta auxiliar para a identificação dos amidos vegetais.

Discussão

A determinação taxonómica da espécie vegetal a partir dos amidos incluídos no CD proporciona informação específica acerca dos alimentos vegetais consumidos, atuando como uma ferramenta auxiliar a outras análises de paleodietas (Fiorenza et al., 2015; Power et al., 2015).

A maioria das espécies estudadas apresenta uma grande variabilidade no

Tabela 3. Caracterização métrica (em mm, intervalo, média e desvio-padrão) dos amidos vegetais das 17 espécies (excluídas a maçã e a pera), organizadas por ordem alfabética do nome científico, que compõem a coleção identificada de referência.

Espécie (nome vulgar)	Família	Comprimento (C)			Largura (L)			C/L		
		Intervalo	\bar{X}	D.P.	Intervalo	\bar{X}	Intervalo	DP	\bar{X}	D.P.
<i>Avena sativa</i> (Aveia)	Poaceae	2,50–37,50	16,70	12,34	2,50–34,50	14,35	10,85	1,00–1,84	1,18	0,20
<i>Castanea sativa</i> (Castanha)	Fagaceae	3,10–20,00	9,23	5,19	2,38–12,50	6,53	2,72	1,00–2,24	1,35	0,31
<i>Cicer arietinum</i> (Grão-de-bico)	Fabaceae	2,70–71,00	20,92	17,37	2,70–43,40	15,20	11,05	1,00–4,50	1,34	0,50
<i>Hordeum vulgare</i> (Cevada)	Poaceae	1,30–36,50	16,68	10,82	1,20–36,50	14,10	9,76	1,00–2,05	1,20	0,22
<i>Ipomoea batatas</i> (Batata-doce)	Convolvulaceae	4,60–24,00	13,74	5,68	4,10–21,00	11,95	4,91	1,00–1,37	1,15	0,12
<i>Lens esculenta</i> (Lentilha)	Fabaceae	4,40–41,20	22,92	13,40	4,40–35,00	16,66	8,81	1,00–1,85	1,31	0,29
<i>Musa sp.</i> (Banana)	Musaceae	18,80–51,30	33,93	10,73	4,40–23,80	12,16	5,46	1,16–6,55	3,28	1,59
<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	Poaceae	1,80–8,00	4,18	1,91	1,70–7,00	3,28	1,65	1,00–2,71	1,32	0,39
<i>Panicum miliaceum</i> (Milho-miúdo)	Poaceae	2,00–13,00	7,14	3,16	1,90–11,70	6,48	2,84	1,00–1,40	1,10	0,12
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão)	Fabaceae	5,00–76,00	26,16	12,96	5,0–33,00	18,66	6,59	1,00–2,53	1,38	0,34
<i>Pisum sativum</i> (Ervilha)	Fabaceae	5,40–29,00	18,71	6,26	5,40–25,20	15,15	5,35	1,00–1,57	1,25	0,20
<i>Prunus dulcis</i> (Amêndoa)	Rosaceae	1,50–31,30	9,98	9,15	1,50–31,20	9,88	8,99	1,00–1,09	1,00	0,02
<i>Secale cereale</i> (Centeio)	Poaceae	1,50–49,50	18,92	13,50	1,10–40,00	14,87	10,76	1,00–2,39	1,29	0,29
<i>Solanum tuberosum</i> (Batata)	Solanaceae	12,80–93,60	47,82	26,41	12,80–76,30	39,61	20,34	1,00–1,81	1,18	0,19
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	Poaceae	1,50–52,50	20,24	13,62	1,50–45,80	16,75	11,96	1,00–2,24	1,26	0,24
<i>Vicia faba</i> (Fava)	Fabaceae	5,30–29,40	16,26	8,09	5,30–20,60	12,48	4,21	1,00–2,04	1,27	0,34
<i>Zea mays</i> (Milho)	Poaceae	2,00–23,00	12,55	5,80	2,00–16,00	9,95	3,86	1,00–2,00	1,23	0,24

Tabela 4. Caracterização morfológica dos amidos vegetais das 17 espécies passíveis de análise, organizadas por ordem alfabética do nome científico.

Espécie (nome vulgar)	Família	Estrutura	Forma
<i>Avena sativa</i> (Aveia)	<i>Poaceae</i>	Compostos e irregulares, divisíveis em grãos menores	Variável: nos pequenos poligonais, nos maiores fusiformes, subelípticas, circulares, etc.
<i>Castanea sativa</i> (Castanha)	<i>Fagaceae</i>	Simples e irregulares	Variável: circulares, subcirculares, subpoligonais, subovais, côncavo-convexos, raramente elípticos
<i>Cicer arietinum</i> (Grão-de-bico)	<i>Fabaceae</i>	Simples e regulares	Variável: maioritariamente elípticos (lobados ou não), também circulares, subcirculares, côncavo-convexos ou plano-convexos
<i>Hordeum vulgare</i> (Cevada)	<i>Poaceae</i>	Simples e irregulares	Variável: elípticos, ovais, plano-convexos, côncavo-convexos, circulares, subcirculares, irregulares ou — sobretudo nos menores — subpoligonais ou poligonais
<i>Ipomoea batatas</i> (Batata-doce)	<i>Convolvulaceae</i>	Simples, por vezes compostos, irregulares	Variável, circulares ou subcirculares, subtriangulares, elípticos, plano-convexos, menos vezes poligonais
<i>Lens esculenta</i> (Lentilha)	<i>Fabaceae</i>	Simples, regulares	Variável: elípticos, circulares, subovais, algumas vezes côncavo-convexos, plano-convexos ou lobados (subtrilobados, etc)
<i>Musa sp.</i> (Banana)	<i>Musaceae</i>	Simples	Variável: subfusiformes, oblongos, subelípticos, subclaviformes, por vezes apiculados
<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	<i>Poaceae</i>	Compostos, irregulares	Poligonais e irregulares
<i>Panicum miliaceum</i> (Milho-miúdo)	<i>Poaceae</i>	Simples, irregulares	Poliédricos (triangulares, quadrados, pentagonais, hexagonais, etc), mais raramente elípticos ou subcirculares
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Feijão)	<i>Fabaceae</i>	Simples, regulares	Variável: elípticos, circulares, oblongos, mais raramente plano-convexos, côncavo-convexos ou ovais
<i>Pisum sativum</i> (Ervilha)	<i>Fabaceae</i>	Simples e compostos (bimodais), regulares	Variável: com padrão tipo “molar”, com 2 a 4 ou mais subunidades
<i>Prunus dulcis</i> (Amêndoa)	<i>Rosaceae</i>	Simples	Circulares ou subcirculares
<i>Secale cereale</i> (Centeio)	<i>Poaceae</i>	Simples, irregulares (os menores)	Variável: elípticos, ovais, plano-convexos, côncavo-convexos, circulares, subcirculares ou — sobretudo nos menores — poligonais
<i>Solanum tuberosum</i> (Batata)	<i>Solanaceae</i>	Simples e regulares	Ovais, elípticos ou, menos vezes, circulares
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	<i>Poaceae</i>	Simples (bimodal), irregulares	Variável: elípticos, ovais, plano-convexos, côncavo-convexos, circulares ou subcirculares. Os menores frequentemente poligonais, subpoligonais ou irregulares
<i>Vicia faba</i> (Fava)	<i>Fabaceae</i>	Compostos e irregulares, divisíveis em grãos menores	Variável: nos pequenos poligonais, nos maiores fusiformes, subelípticas, circulares, etc
<i>Zea mays</i> (Milho)	<i>Poaceae</i>	Simples e irregulares	Variável: circulares, subcirculares, subpoligonais, subovais, côncavo-convexos, raramente elípticos

Superfície	Hilo	Camadas de deposição
Lisa	Inconspício, mas quando visível concêntrico, alongado e dividido	Difíceis de visualizar (ver estrutura, Figura 2A)
Lisa	Concêntrico e alongado, ramificado, nos maiores Punctiforme ou inconspício nos menores	Inconspícias ou não-definidas
Lisa	Alongado, embora possa bifurcar-se nas extremidades	Conspícias nos grãos maiores
Lisa	Ausente Quando visível, concêntrico, alongado e ramificado nas extremidades	Conspícias nos grãos maiores
Lisa	Concêntrico ou levemente excêntrico, punctiforme ou dividido nos compostos, ramificado	Conspícias nos maiores, inconspícias nos menores
Lisa	Concêntrico, conspício, alongado, não raramente bifurcado nas extremidades	Conspícias
Irregular	Excêntrico, conspício, alongado	Conspícias
Lisa	Inconspício	Inconspícias
Lisa	Conspício, concêntrico, em forma de +, Y, estrela (tri, penta, hexarradiada), H Raramente em linha quebrada	Geralmente não-definidas
Lisa	Concêntrico, conspício, alongado, alongado-estrelado ou punctiforme	Conspícios nos médios-grandes
Lisa	Ramificado, definindo subunidades bem marcadas Raramente punctiforme nos grãos simples	Não-definidas
Irregular	Inconspício	Inconspícias
Lisa	Concêntrico, conspício nos maiores, alongado, estrelado ou punctiforme	Conspícias nos maiores
Lisa	Excêntrico, conspício, oval, elíptico ou, menos vezes, circular	Conspícias
Lisa	Inconspício ou alongado-punctiforme	Conspícias, nos maiores
Lisa	Inconspício, mas quando visível concêntrico, alongado e dividido	Difíceis de visualizar (ver estrutura, Figura 2P)
Lisa	Concêntrico e alongado, ramificado, nos maiores Punctiforme ou inconspício nos menores	Inconspícias ou não definidas

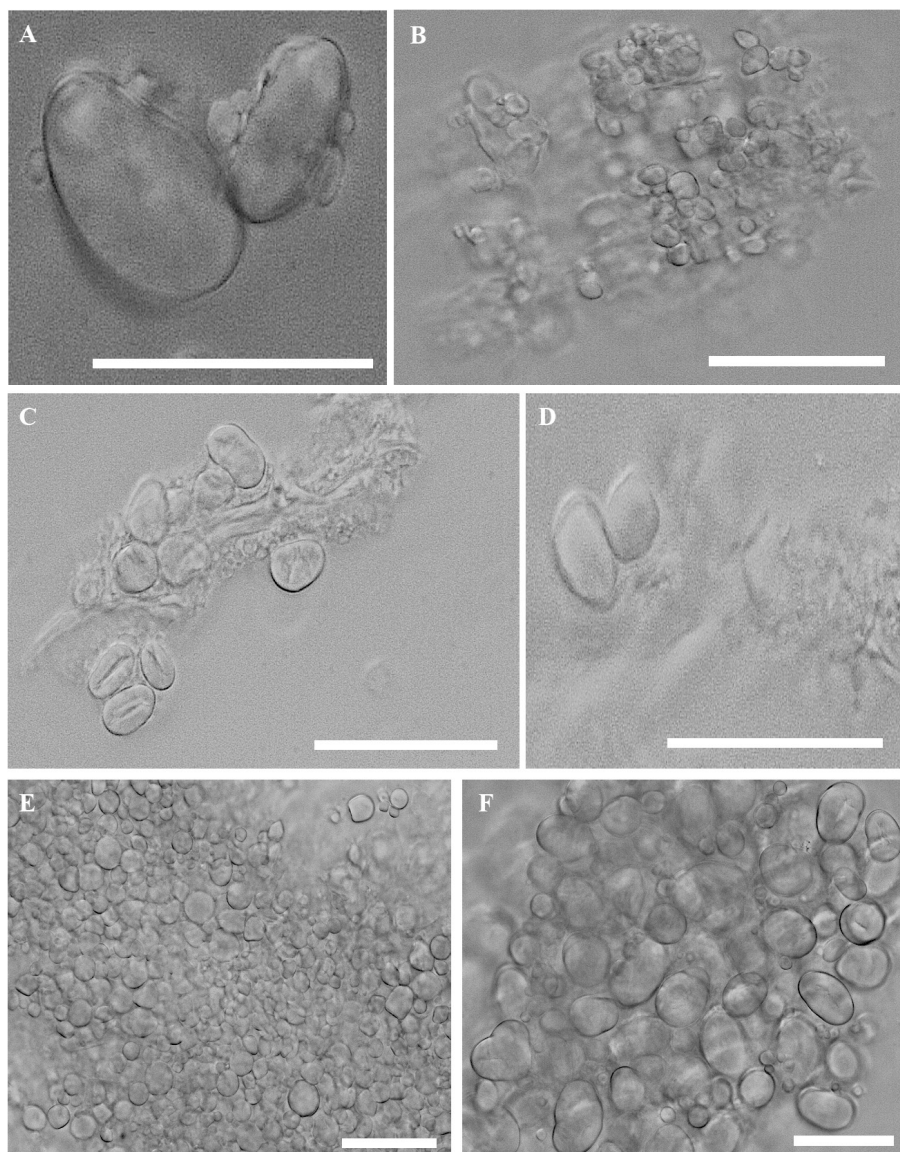


Figura 2. Visualização dos grânulos de amido com microscopia ótica. A) Aveia – *Aveia sativa* L.; B) Castanha – *Castanea sativa* L.; C) Grão-de-bico – *Cicer arietinum* L.; D) Cevada – *Hordeum vulgare* L.; E) Batata doce – *Ipomoea batatas* (L.) Lam.; F) Lentilha – *Lens culinaris* Medikus. Barra: 50µm.

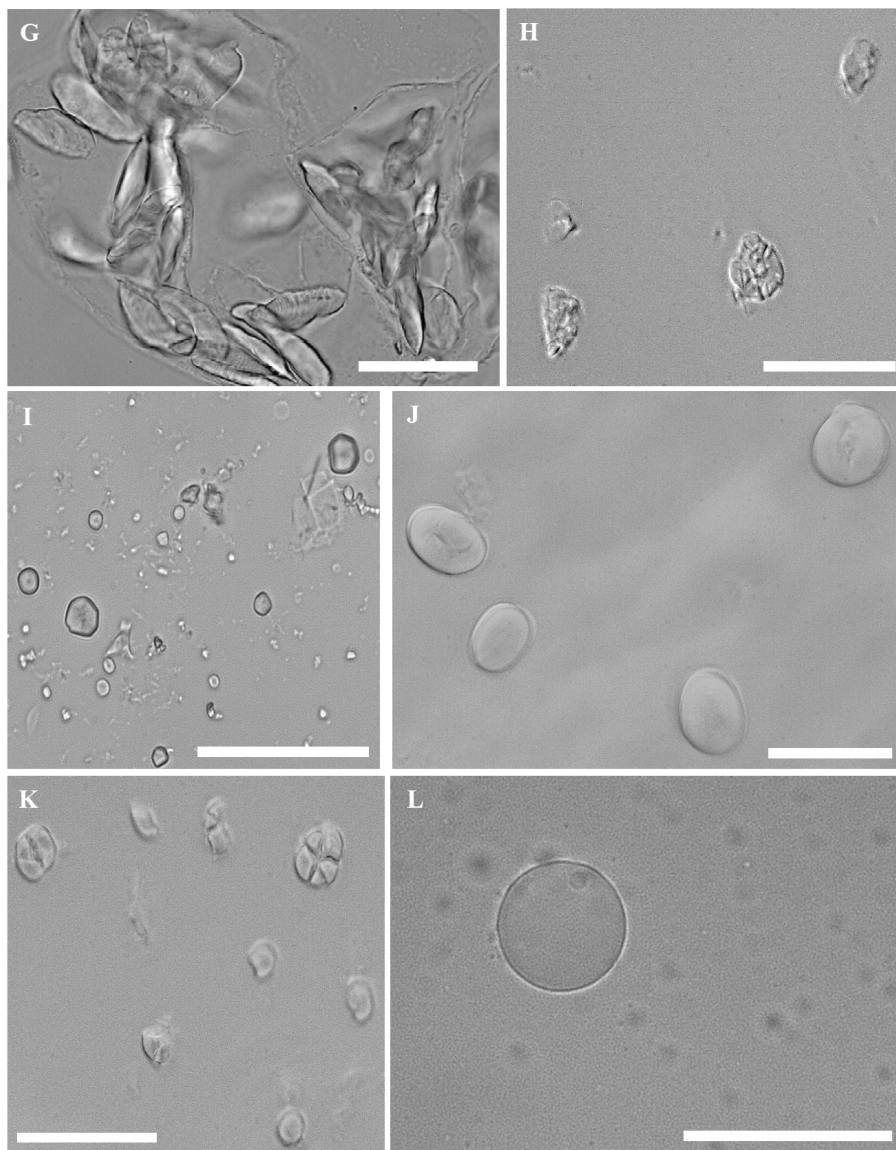


Figura 2. (Continuação). G) Banana – *Musa* sp.; H) Arroz - *Oryza sativa* L.; I) Milho-miúdo – *Panicum miliaceum* L.; J) Feijão - *Phaseolus vulgaris* L.; K) Ervilha – *Pisum sativum* L.; L) Amêndoa – *Prunus amygdalus* Batsch. Barra: 50µm.

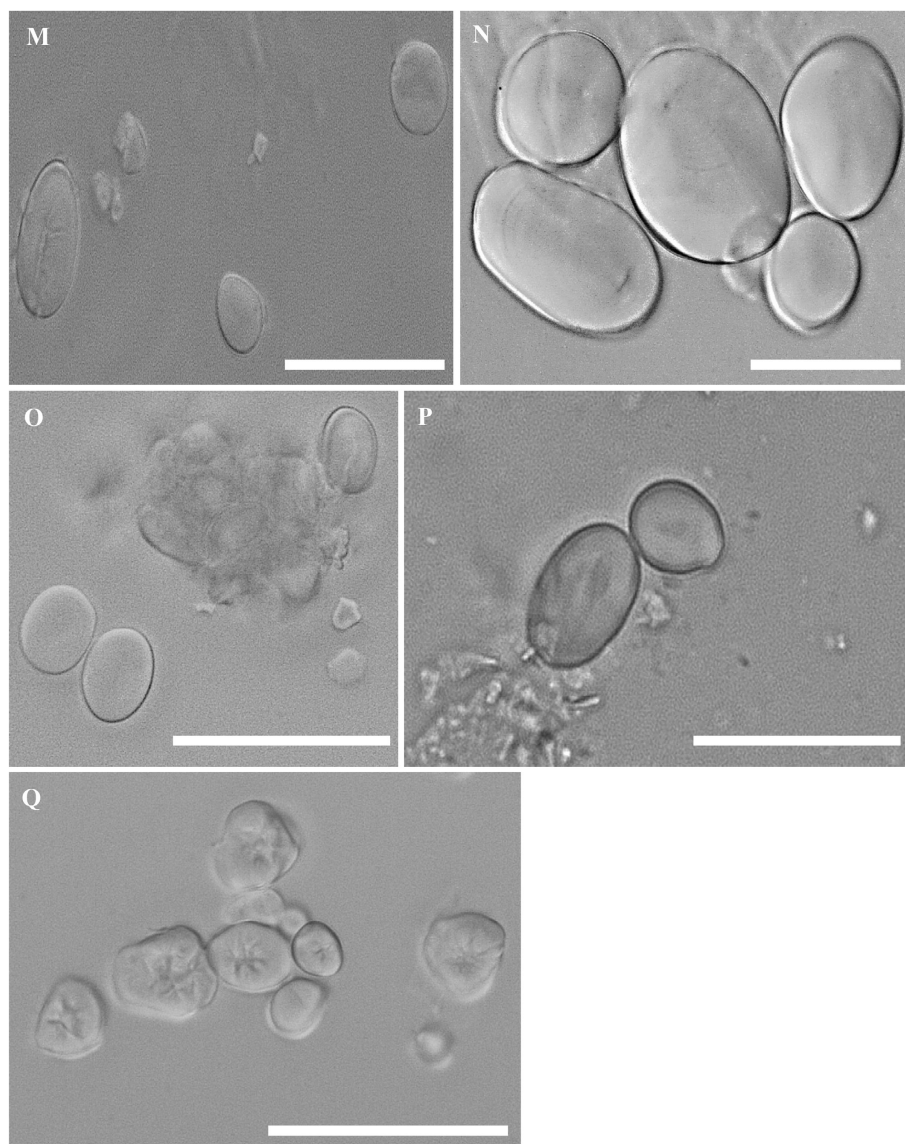


Figura 2. (Continuação). M) Centeio - *Secale cereale* L.; N) Batata - *Solanum tuberosum* L.; O) Trigo - *Triticum aestivum* L.; P) Fava - *Vicia faba* L.; Q) Milho - *Zea mays* L. Barra: 50µm.

comprimento dos grãos de amido. Contrariamente, a largura parece ser uma variável mais conservadora, uma vez que apenas quatro espécies — a aveia, o centeio, a batata e o trigo — apresentam desvios consideráveis (Tabela 3). Em qualquer caso, os amidos mais compridos estão representados pela espécie *Musa sp.* (banana: $33,93 \pm 10,73$ mm), os mais largos pela espécie *Solanum tuberosum* (batata: $39,61 \pm 20,34$ mm) e os menores pertencem à espécie *Oryza sativa* (arroz: comprimento $4,18 \pm 1,91$ mm; largura $3,28 \pm 1,65$ mm).

Segundo a literatura, os cereais, gramíneas ou a família *Poaceae*, apresentam amidos mais difíceis de amostrar pela sua menor humidade e associação com proteínas (El Halal et al., 2019). Os amidos do trigo — *Triticum aestivum* L. —, do centeio — *Secale cereale* L. —, e da cevada — *Hordeum vulgare* L. — tendem a ser bimodais, ou seja, apresentar, ao mesmo tempo, grânulos pequenos e grandes (Hardy et al., 2009). Por sua parte, a aveia — *Avena sativa* L. —, o milho — *Zea mays* L. — e, sobretudo, o arroz — *Oryza sativa* L. — apresentam os grãos de amido mais pequenos de todos os cereais, com formas irregulares e, em muitos casos, formando aglomerados pela associação com proteínas (Jane et al., 1994; El Halal et al., 2019). Comparativamente, as dimensões obtidas para os amidos de milho e arroz encontram-se dentro dos intervalos de medida publicados (Piperno e Holst, 1998; Henry et al., 2011; Utrilla-Coello et

al., 2014). A aveia e a cevada enquadram-se nos valores dos grãos mais pequenos (Jane et al., 1994; Henry et al., 2011), mas, tal como o trigo e o centeio, também ultrapassam os valores dos grãos grandes (Yang e Perry, 2013), duplicando ou triplicando os comprimentos apresentados em publicações anteriores (*Triticum*: Henry et al., 2011; *Avena*: Jane et al., 1994). A diferenciação entre o milho-miúdo (*Panicum miliaceum*) e o milho-comum (*Zea mays*), depende, fundamentalmente do seu tamanho, dado que o primeiro, de acordo com Kim et al. (2012), tende a ser menor.

Segundo Bermoussa et al. (2004), os amidos dos tubérculos são mais resistentes à degradação das amílases bucais do que os dos cereais, devido à sua estrutura celular, cristalina, molecular e morfologia (Villarroel et al., 2018). Como se pode comprovar, a batata — *Solanum tuberosum* L. — e a batata-doce — *Ipomoea batatas* (L.) Lam. — podem possuir grânulos de dimensões consideráveis (Hardy et al., 2009). Em ambos os casos, a métrica realizada na coleção identificada enquadra-se nos intervalos descritos por Sujka e Jamroz (2013) para a batata e Pagán-Jiménez (2015) para a batata-doce.

Os amidos das leguminosas (família Fabaceae) podem constituir quase metade da composição da semente, apresentando características muito semelhantes entre si (Hoover e Sosulski, 1991). No grão-de-bico — *Cicer arietinum* L. — e no feijão — *Phaseolus vulgaris* L. — os amidos

possuem fissuras centrais características (Sathe e Salunkhe, 1981), mas o maior tamanho e a forma mais esférica do primeiro podem possibilitar a sua individualização (Henry et al., 2011). A ervilha — *Pisum sativum* L. —, por seu lado, apresenta os amidos mais pequenas dentro desta família (Hoover e Sosulski, 1991). Finalmente, a lentilha — *Lens culinaris* L. — pode apresentar uma ligeira depressão na região central (Wang et al., 2017), enquanto na fava — *Vicia faba* L. — aparece um elemento diferenciador, sob a forma de cavidades nas superfícies externas dos seus grânulos de amido (ver Punia et al., 2019).

Dentro da família *Fagaceae*, salienta-se a castanha — *Castanea sativa* L. —, cuja repercussão económica, no território português, tem sido de extrema importância na região de Trás-os-Montes (Silva et al., 2015), desde as civilizações antigas (Coelho, 2018). Segundo Pizzoferrato e colaboradores (1999), o seu conteúdo amídico é abundante, situando este fruto entre os elementos mais ricos em amido, tal como a batata e o feijão. Os grânulos de amido da castanha podem diferenciar-se de outras espécies de fagáceas, como a bolota (*Quercus* sp.), quer pelas dimensões, quer pelo hilo, pois, enquanto no primeiro caso é excêntrico, na bolota costuma estar centrado (Cappai et al., 2013).

Quanto à família *Rosaceae*, a amêndoa não apresenta uma informação muito profusa. No entanto, na tese de Sirvent Aliu (2019), encontram-se características semelhantes às descritas neste trabalho. Com efeito, resta salientar que, nos grãos

aqui estudados, as dimensões tendem a ser ligeiramente superiores às descritas, em intervalos de comprimento que abrangem dos 1,5 μm aos 31,1 μm .

Finalmente, no que respeita aos amidos da banana (família *Musaceae*), dentro dos grãos estudados é, sem dúvida, o que melhor se individualiza, devido às suas características morfológicas, às quais se adaptam perfeitamente as descrições publicadas previamente (Zhang et al., 2005).

Comentários finais

Este trabalho sumariza os passos dum protocolo para extração de amidos vegetais de várias durezas, sejam frescos, secos, em pó ou retidos no cálculo dentário, e apresenta uma chave dicotómica e imagens de microscopia ótica que auxiliam a identificação de 19 espécies (aveia, cevada, trigo, milho-miúdo, centeio, milho, arroz, grão-de-bico, lentilha, feijão, ervilha, fava, castanha, batata-doce, banana, amêndoa e batata), sendo que a maçã e a pera, por possuírem concentrações mínimas de amido, são pouco relevantes para este tipo de estudos.

Trata-se de um protocolo fácil e de rápida execução (4 dias), baseado na aplicação dum ácido fraco e de instrumentos comuns em laboratórios (p.ex., centrífugadora, frigorífico, frascos de vidro, microscópio ótico), o que o torna económico e acessível aos investigadores. São igualmente facultadas orientações para se implementarem, quando possível, técnicas químicas (Solutio de Lugol) e físicas (microscopia ótica de luz

polarizada ou eletrônica de varrimento) embora a microscopia ótica seja suficiente para a identificação dos amidos vegetais.

Este tipo de estudos pode abrir novos trilhos na reconstrução da dieta no passado, coadjuvado por exemplares para comparação, perspetivando um aumento dos estudos e do conhecimento sobre o consumo humano de alimentos ricos em amido, nomeadamente extraídos do cálculo dentário. Está ainda prevista a ampliação da coleção identificada com outros amidos, designadamente de espécies menos comuns no contexto nacional.

Agradecimentos

A Licínio Manco, Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade de espaço e material de laboratório, e a Elsa Gomes, Departamento de Ciências da Terra da Universidade de Coimbra, pela dedicação colocada nas técnicas de microscopia eletrônica de varrimento empregues neste estudo.

Aos dois revisores anónimos que melhoraram o conteúdo deste manuscrito através dos seus comentários e sugestões.

Ao Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS, UID/ANT/00283/2020) e à FCT (referência SFRH/BD/115691/2016 [AMC]).

Referências bibliográficas

Abbo, S.; Berger, J.; Turner, N. 2003. Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adap-

tation. *Functional Plant Biology*, 30(10): 1081–1087. DOI: 10.1071/FP03084.

Aceituno Bocanegra, F. J.; López Sáez, J. A. 2012. Caracterización morfológica de almidones de los géneros *Triticum* y *Hordeum* en la Península Ibérica. *Trabajos de Prehistoria*, 69(2): 332–348. DOI: 10.3989/tp.2012.12095.

American Diabetes Association. s. d. *Non-starchy vegetables*. [Online]. [Arlington], American Diabetes Association. [Consultado em 712020]. Disponível em: <https://www.diabetes.org/nutrition/healthy-food-choices-made-easy/non-starchy-vegetables>.

Anderson, J. W.; Baird, P.; Davis Jr, R. H.; Ferreri, S.; Knudtson, M.; Koraym, A.; Waters, V.; Williams, C. L. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4): 188–205. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x.

Antia, B. S.; Akpan, E. J.; Okon, P. A.; Umoren, I. U. 2006. Nutritive and antinutritive evaluation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(2): 166–168. DOI: 10.3923/pjn.2006.166.168.

Atkins, P. J.; Bowler, I. R. 2001. *Food in society: economy, culture, geography*. London, Arnold.

Aura, J. E.; Carrión, Y.; Estrelles, E.; Péres Jordà, G. 2005. Plant economy of hunter-gatherer groups at the end of the last Ice Age: plant macroremains from the cave of Santa Maira (Alacant, Spain) ca. 12000–9000 B.P. *Vegetation History and Archaeobotany*, 14(4): 542–550. DOI: 10.1007/s00334-005-0002-1.

Balfourier, F.; Bouchet, S.; Robert, S.; Oliveira, R.; Rimbart, H.; Klitt, J.; Choulet, F.; Internation

- Wheat Genome Sequencing Consortium, BreedWheat Consortium, Paux, E. 2019. Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Science*, 5: 1–10. DOI: 10.1126/sciadv.aav0536.
- Barton, H.; Torrence, R. 2015. Cooking up recipes for ancient starch: assessing current methodologies and looking to the future. *Journal of Archaeological Science*, 56: 194–201. DOI: 10.1016/j.jas.2015.02.031.
- Behre, K. 1992. The history of rye cultivation in Europe. *Vegetation History and Archaeobotany*, 1: 141–156. DOI: 10.1007/BF00191554.
- Bento, A.; Gonçalves, C.; Cordeiro, T.; Almeida, M.D.V. 2018. Portugal nutritional transition during the last 4 decades: 1974–2011. *Porto Biomedical Journal*, 3: 3. DOI: 10.1016/j.pbj.0000000000000025.
- Berglund-Brücher, B.; Brücher, H. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aboriginus* Burk.) as an ancestor of the common bean. *Economic Botany*, 30(3): 257–272.
- Bermoussa, M.; Suhendra, B.; Aboubacar, A.; Hamaker, B. 2004. Distinctive sorghum starch granule morphologies appear to improve raw starch digestibility. *Starch/Stärke*, 58(2): 92–99. DOI: 10.1002/star.200400344.
- Bowen, W. H. 2013. The Stephan curved revisited. *Odontology*, 101: 2–8. DOI: 10.1007/s10266-012-0092-z.
- Boyadjian, C. H. C. 2012. *Análise e identificação de microvestígios vegetais de cálculo dentário para a reconstrução de dieta sambaquieira: estudo de caso de Jabuticabeira II*, SC. Dissertação de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Buckley, S.; Usai, D.; Jakob, T.; Radini, A.; Hardy, K. 2014. Dental calculus reveals unique insights into food items, cooking and plant processing in prehistoric central Sudan. *PLoS ONE*, 9(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0100808.
- Cappai, M. G.; Alesso, G. A.; Nieddu, G.; Sanna, M.; Pinna, W. 2013. Electron microscopy and composition of raw acorn starch in relation to in vivo starch digestibility. *Food & Function*, 4(6): 917–922. DOI: 10.1039/c3fo60075k.
- Cascão, R. 2011. Modos de habitar. In: Matosso J. (ed.). *História da vida privada em Portugal. A Idade Contemporânea*. Maia, Círculo de Leitores e Temas e Debates: 56–91.
- Charlier, P.; Huynh-Charlier, I.; Munoz, O.; Billard, M.; Brun, L.; Grandmaison, G. L. D. 2010. The microscopic (optical and SEM) examination of dental calculus deposits (DCD). Potential interest in forensic anthropology of a bio-archaeologic method. *Legal Medicine*, 12(4): 163–171. DOI: 10.1016/j.legalmed.2010.03.003.
- Clerici, M. T. P. S.; Sampaio U. M.; Schmiele, M. 2019. Identification and analysis of starch. In: Clerici, M. T. P. S.; Schmiele, M. (eds.). *Starches for food application. Chemical, technological and health properties*. London, Academic Press: 23–69.
- Coelho, M. H. C. 2018. Um doce e nutritivo fruto: A castanha na história da alimentação e da gastronomia portuguesas. In: Soares, C.; Ribeiro C. S. G. (eds.). *Mesas luso-brasileiras: alimentação, saúde & cultura*. Coimbra, Imprensa da Universidade de

- Coimbra: 103–176. DOI: 10.14195/978-989-26-1720-6_6.
- Correia, P.; Cruz-Lopes, L.; Beirão-da-Costa, L. 2012. Morphology and structure of chestnut starch isolated by alkali and enzymatic methods. *Food Hydrocolloids*, 28(2): 313–319. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.12.013.
- Cristiani, E.; Radini, A.; Edinborough, M.; Borić, D. 2016. Dental calculus reveals Mesolithic foragers in the Balkans consumed domesticated plant foods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 10298–10303. DOI: 10.1073/pnas.1603477113.
- Cristiani, E.; Radini, A.; Borić, D.; Robson, H. K.; Caricola, I.; Carra, M. L.; Mutri, G.; Oxilia, G.; Zupanchich, A.; Šlaus, M.; Vujević, D. 2018. Dental calculus and isotopes provide direct evidence of fish and plant consumption in Mesolithic Mediterranean. *Nature*, 8: 8147. DOI: 10.1038/s41598-018-26045-9.
- Crowther, A.; Haslam, M.; Oakden, N.; Walde, D.; Mercader, J. 2014. Documenting contamination in ancient starch laboratories. *Journal of Archaeological Science*, 49: 90–104. DOI: 10.1016/j.jas.2014.04.023.
- Dawes, C. 2006. Why does supragingival calculus form preferentially on the lingual surface of the 6 lower anterior teeth? *Journal of the Canadian Dental Association* [Online], 72(10): 923–926. Disponível em: <http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-72/issue-10/923.html>.
- Dawes, C. 2008. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *The Journal of the American Dental Association*, 139 (Suppl.5): 18S–24S. DOI: 10.14219/jada.archive.2008.0351.
- El Halal, S. L. M.; Kringel, D. H.; Zavareze, E. R.; Guerra Dias, A. R. 2019. Methods for extracting cereal starches from different sources: a review. *Starch/Stärke*, 71(11–12). DOI: 10.1002/star.201900128.
- FAO — Food and Agriculture Organization of the United Nations, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. 2019. *The state of food security and nutrition in the world. Safeguarding against economic slowdowns and downturns*. Rome, FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca5162en/ca5162en.pdf>.
- Ferreira, N. P. S. 2008. A alimentação portuguesa na idade medieval. *Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação* [Online], 14(3): 104–114. Disponível em: <http://www.spcna.pt/publicacoes/?imc=7n&publicacao=21&ediacao=68&fmo=pa>.
- Florenza, L.; Benazzi, S.; Henry, A. G.; Salazar-García, D. C.; Picin, A.; Wroe, S.; Kulmer, O. 2015. To meat or not to meat? New perspectives on Neanderthal ecology. *American Journal of Physical Anthropology*, 156(Suppl.59): 43–71. DOI: 10.1002/ajpa.22659.
- Fons-Badal, C.; Fons-Font, A.; Labaig-Rueda, C.; Solá-Ruiz, M.F.; Selva-Otaolaurruchi, E.; Agustín-Panadeiro, R. 2020. Analysis of predisposing factor for rapid dental calculus formation. *Journal of Clinical Medicine*, 9: 858. DOI: 10.3390/jcm9030858.
- Fuller, D. Q.; Sato, Y.; Castillo, C.; Quin, L.; Weiskopf, A. R.; Kingwell-Banham, E. J.; Song, J.; Ahn, S.; Etten, J. 2010. Consilience of genetic and archaeobotany in the entangled history of rice. *Archaeological & Anthropological Science*, 2: 115–131. DOI: 10.1007/s12520-010-0035-y.

- Gepts, P. A. 1988. Middle American and Andean gene pool. In: Gepts, P. A. (ed.). *Genetic resources of Phaseolus beans*. Dordrecht, Kluwer: 375–390.
- Gonçalves, I. 2011. A alimentação. In: Mattoso, J. (ed.). *História da vida privada em Portugal. A Idade Média*. Portugal, Círculo de Leitores e Temas e Debates: 226–259.
- Guismondi, A.; D'Agostino, A.; Canuti, L.; Di Marco, G.; Basoli, F.; Canini, A. 2018. Starch granules: a data collection of 40 food species. *Plant Biosystems*, 153(2): 273–279. DOI: 10.1080/11263504.2018.1473523.
- Han, X. Z.; Hamaker, B. R. 2002. Location of starch granule-associated proteins revealed by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Cereal Science*, 35(1): 109–116. DOI: 10.1006/jcrs.2001.0420.
- Hardy, K. 2007. Food for thought: starch in Mesolithic diet. *Mesolithic Miscellany*, 18(2): 2–11.
- Hardy, K.; Blakeney, T.; Kirkham, J.; Wrangham, R.; Collins M. 2009. Starch granules, dental calculus and new perspectives on ancient diet. *Journal of Archaeological Science*, 36(2): 248–255. DOI: 10.1016/j.jas.2008.09.015.
- Hassan, H. 2018. *Effect of acid and alkali formation on pH in the dental biofilm reference to caries*. PhD Dissertation in Odontology, Department of Oral Microbiology and Immunology, Institute of Odontology at The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg.
- Hawkes, J. G. 1978. History of the potato. In: Harris P. M. (ed.). *The Potato Crop. The scientific basis for improvement*. Dordrecht, Springer: 1–14.
- Hawkes, J. G. 1990. *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. London, Belhaven Press.
- Henry, A. G.; Piperno, D. R. 2008. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqāi, Syria. *Journal of Archaeological Science*, 35(7): 1943–1950. DOI: 10.1016/j.jas.2007.12.005.
- Henry, A. G.; Brooks, A. S.; Piperno, D. R. 2011. Microfossils in calculus demonstrate consumption of plants and cooked foods in Neanderthal diets (Shanidar III, Iraq; Spy I and II, Belgium). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2): 486–491. DOI: 10.1073/pnas.1016868108.
- Hillson, S. 1996. *Dental anthropology*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hillson, S. 2005. *Teeth*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hjelmqvist, H. 1989. *A cereal find from Old Etruria: studies in Mediterranean Archaeology and Literature*. Uppsala, Astrom Editions.
- Hoover, R.; Sosulski, F. 1991. Composition, structure, functionality, and chemical modification of legume starches: a review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(1): 79–92. DOI: 10.1139/y91-012.
- Humphrey, L. R.; De Groote, I.; Morales, J.; Barton, N.; Collcutt, S.; Ramsey, C. B.; Bouzouggar, A. 2014. Earliest evidence for caries and exploitation of starchy plant foods in Pleistocene hunter-gatherers from Morocco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3): 954–959. DOI: 10.1073/pnas.1318176111.

- ICSN. 2011. *International Code for Starch Nomenclature*. [Online]. [Alexandria, VA], Foundation for Archaeobotanical Research in Microfossils. [Acedido em 29-1-2020]. Disponível em: <http://fossilfarm.org/ICSN/Code.html>.
- Jane, J.; Kasemsuwan, T.; Leas, S.; Ames, I. A.; Zobel, H.; Darien, I. L.; Robyt, J. F.; Ames, I. A. 1994. Anthology of starch granule morphology by Scanning Electron Microscopy. *Starch/Stärke*, 46(4): 121–129. DOI: 10.1002/star.19940460402.
- Jin, Y.; Yip, H. 2002. Supragingival Calculus: formation and control. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(5): 426–441. DOI: 10.1177/154411130201300506.
- Keyes, P. H.; Rams, T. E. 2016. Dental calculus arrest of dental caries. *Journal of Oral Biology*, 3: 4. DOI: 10.13188/2377-987x.1000017.
- Kiple, K. F.; Ornelas, K. C. 2000. *The Cambridge world history of food*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Kim, S. K.; Choi, H. J.; Kang, D. K.; Kim, H. Y. 2012. Starch properties of native proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Agronomy Research*, 10(1–2): 311–318. Disponível em: <https://agronomy.emu.ee/vol101/p10104.pdf>.
- Kutík, J.; Benes, K. 1977. Permanent slides after detection of starch grains with Lugol's Solution. *Biologia Plantarum*, 19(4): 309–312. DOI: 10.1007/BF02923135.
- Laurence, A. R.; Thoms, A. V.; Bryant, V. M.; McDonough, C. 2011. Airborne starch granules as a potential contamination source at archaeological sites. *Journal of Ethnobiology*, 31: 213–232. DOI: 10.2993/0278-0771-31.2.213.
- Lieverse, A. R. 1999. Diet and the aetiology of dental calculus. *International Journal of Osteoarchaeology*, 9(4): 219–232. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1212(199907/08)9:4<219:AID-OA475>3.0.CO;2-V.
- Lieverse, A. R.; Link, D. W.; Bazaliiskiy, V. I.; Goriunova, O. I.; Weber, A.W. 2007. Dental health indicators of hunter-gatherer adaptation and cultural change in Siberia's Cis-Baikal. *American Journal of Physical Anthropology*, 134: 323–339. DOI: 10.1002/ajpa.20672.
- Loy, T. H. 1994. Methods in the analysis of starch residues on prehistoric stone tools. In: Hather, J. G. (ed.). *Tropical archaeobotany: applications and new developments*. London, Routledge: 86–114.
- Margolis, H. C. 1990. An assessment of recent advances in the study of the chemistry and biochemistry of dental plaque fluid. *Journal of Dental Research*, 69: 1337–1342. DOI:10.1177/00220345900690062201.
- Martin, K. E. 2016. *Glycaemic response to varying the proportions of starchy foods and non-starchy vegetables within a meal: arandomised controlled trial*. Master dissertation in Dietetics, University of Otago.
- Middleton, W. D., Rovner, I. 1994. Extraction of opal phytoliths from herbivore dental calculus. *Journal of Archaeological Science*, 21: 469–473. DOI: 10.1006/jasc.1994.1046.
- Miller, T. E. 1987. Systematics and evolution. In: Lupton, F. G. H. (ed.). *Wheat breeding: its scientific basis*. Dordrecht, Springer-Science+Business Media, B.V.: 1–30.
- Moreno-Larrazabal, A.; Teira-Brión, A.; Sopelana-Salcedo, I.; Arranz-Otaegui, A.; Zapata,

- L. 2015. Ethnobotany of millet cultivation in the north of the Iberian Peninsula. *Vegetation History and Archaeobotany*, 24: 541–554. DOI: 10.1007/s00334-015-0518-y.
- Pagán-Jimenez, J. R. 2015. *Almidones. Guía de material comparativo moderno del Ecuador para los estudios paleoetnobotánicos en el neotrópico*. Buenos Aires, Aspha.
- Pagán-Jimenez, J. R.; Saavedra López, P. R.; Guachamín-Tello A. M. 2015. *Análisis de residuos microbotánicos (almidones) en varios objetos cerámicos relacionados con la confección y el consumo de bebidas prehispánicas*. Colección Avilés Marquillo. Instituto Nacional de Patrimonio Cultural. Quito, Ecuador. DOI: 10.13140/RG.2.1.1073.6406.
- Pedersen, A. M. L.; Belstrøm, D. 2019. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*, 80: S3–S12. DOI: 10.1016/j.jdent.2018.08.010.
- Peña-Chocarro, L.; Pérez-Jordà, G.; Alonso, N.; Antolín, F.; Teira-Brión, A.; Tereso, J. P.; Montes Moya, E. M.; López Reyes, D. 2019. Roman and medieval crops in the Iberian Peninsula: A first overview of seeds and fruits from archaeological sites. *Quaternary International*, 499: 49–66. DOI: 10.1016/j.quaint.2017.09.037.
- Pereira, P.; Sianto, L.; Chaves, S. A.; Teixeira-Santos, I.; Gonçalves, D.; Santos, A. L.; Toso, A.; Monge Calleja, A. M.; Coutinho, A.; Araújo, A. C.; Godinho, R. 2017. A Necrópole do Largo da Igreja (Sarilhos Grandes): evidências bioarqueológicas de contato entre Portugal e o Novo Mundo. *Actas do Colóquio "Sines: O porto e o mar. História e Património"*. Sines, 7 a 9 de setembro de 2017. Sines, Arquivo Municipal de Sines: 109–127. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/45569>.
- Pérez-Jordá, G.; Peña-Chocarro, L.; García Fernández, M.; Vera Rodríguez, J. C. 2017. The beginnings of fruit tree cultivation in the Iberian Peninsula: plant remains from the city of Huelva (southern Spain). *Vegetation History and Archaeobotany*, 26: 527–538. DOI: 10.1007/s00334-017-0610-6.
- Piperno, D. R.; Holst, I. 1998. The presence of starch grains on Prehistoric Stone tools from the humid neotropics: Indications of early tuber use and agriculture in Panama. *Journal of Archaeological Science*, 25: 765–776. DOI: 10.1006/jasc.1997.0258.
- Pizzoferrato, L.; Rotilio, G.; Paci, M. 1999. Modification of structure and digestibility of chestnut starch upon cooking: A solid state ¹³C CO MAS NMR and enzymatic degradation study. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 47(10): 4060–4063. DOI: 10.1021/jf9813182.
- Power, R. C.; Salazar-García, D.; Wittig, R. M.; Henry, A. G. 2014. Assessing use and suitability of scanning electron microscopy in the analysis of micro remains in dental calculus. *Journal of Archaeological Science*, 49: 160–169. DOI: 10.1016/j.jas.2014.04.016.
- Power, R. C.; Salazar-García, D. C.; Wittig, R. M.; Freiberg, M.; Henry, A. G. 2015. Dental calculus evidence of Tai Forest Chimpanzee plant consumption and life history transitions. *Scientific Reports*, 5(15161): 1–13. DOI: 10.1038/sreo15161.

- Punia, S.; Dhull, S. B.; Sandhu, K. S.; Kaur, M. 2019. Faba bean (*Vicia faba*) starch: Structure, properties, and in vitro digestibility — a review. *Legume Science*, 1(1). DOI: 10.1002/leg3.18.
- Radini, A.; Nikita, E.; Buckley, S., Copeland, L.; Hardy, K. 2016. Beyond food: the multiple pathway for inclusion of materials into ancient dental calculus. *American Journal of Physical Anthropology*, 162(Suppl.63): 71–83. DOI: 10.1002/ajpa.23147.
- Redden, R. J.; Berger, J. D. 2007. History and origin of chickpea. In: Yadav, S. S.; Redden, R. J.; Chen, W.; Sharma, B. (eds.) *Chickpea breeding and management*. London, CAB International: 1–13.
- Rodrigues, T. F. 2008. *História da população portuguesa. Das longas permanências à conquista da modernidade*. Porto, Edições Afrontamento.
- Ron, A. M.; González, A. M.; Rodiño, A. P.; Santalla, M.; Godoy, L.; Papa, R. 2016. History of the common bean crop: Its evolution beyond its areas of origin and domestication. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 192: 1–11. DOI: 10.3989/arbor.2016.779n3007.
- Sathe, S. K.; Salunkhe, D. K. 1981. Isolation, partial characterization and modification of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starch. *Journal of Food Science*, 46: 617–621. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1981.tb04924.x.
- Silva, A. P.; Oliveira, I.; Silva, M. E.; Guedes, M. E.; Borges, O.; Magalhães, B.; Gonçalves, B. 2015. Starch characterization in seven raw, boiled and roasted chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1): 438–358. DOI: 10.1007/s13197-015-2047-1.
- Sirvent Aliu, C. 2019. *Estudio de microrrestos de granos de almidón en cerámica culinaria medieval*. Trabajo de Fin de Grado, Facultad de Geografía e Historia, Universitat de Barcelona.
- Sood, S.; Bhardwaj, V.; Pandey, S. K.; Chakrabarti, S. K. 2017. History of potato breeding: Improvement, diversification, and diversity. In: Chakrabarti, S. K.; Xie, C.; Tiwari, J. K. (eds.). *The potato genome*. Switzerland, Springer: 31–72.
- Soto, M.; Inwood, J.; Clarke, S.; Crowther, A.; Covelli, D.; Favreau, J.; Itambu, M.; Larter, S.; Lee, P.; Lozano, M.; Maley, J.; Mwambwiga, A.; Patalano, R.; Sammynaiken, R.; Vergès, J. M.; Zhu, J.; Mercader, J. 2019. Structural characterization and decontamination of dental calculus for ancient starch research. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 11: 4847–4872. DOI: 10.1007/s12520-019-00830-7.
- Stokey, G. K. 2008. The effect of saliva on dental caries. *Journal of American Dental Association*, 139: S11–S17. DOI: 10.14219/jada.archive.2008.0347.
- Sujka, M.; Jamroz, J. 2003. Ultrasound-treated starch: SEM and TEM imaging, and functional behavior. *Food Hydrocolloids*, 31(2): 413–419. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.027.
- Torrence, R.; Barton, H. 2006. *Ancient starch research*. New York, Routledge.
- Tromp, M.; Dudgeon, J. V. 2015. Differentiating dietary and non-dietary microfossils extracted from human dental calculus: the

- importance of sweet potato to ancient diet on Rapa Nui. *Journal of Archaeological Science*, 54: 54–63. DOI: 10.1016/j.jas.2014.11.024.
- Utrilla-Coello, R. G.; Hernández-Jaimes, C.; Carrillo-Navas, H.; González, F.; Rodríguez, E.; Bello-Pérez, L. A.; Vernon-Carter, E. J.; Álvarez-Ramírez, J. 2014. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 103: 596–602. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.046.
- Vaquinhas, I. 2005. Breve história sobre a cultura do arroz nos campos do Mondego. In: Associação dos Agricultores do Vale do Mondego (ed.). *Saberes e sabores do arroz carolino do baixo Mondego*. Carapinheira, Associação dos Agricultores do Vale do Mondego: 14–22. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/36532>.
- Vásquez Sánchez, V. F.; Rosales Tham, T. E. 2007. Técnicas microscópicas y granos de almidón antiguos. *Archaeobios*, 1. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2982289>
- Villarroel, P.; Gómez, C.; Vera, C., Torres, J. 2018. Almidón resistente: Características tecnológicas e intereses fisiológicos. *Revista Chilena de Nutrición*, 45(3): 271–278. DOI: 10.4067/S0717-75182018000400271.
- Vinhas M. E. G. V. 2012. *Assistência em fim de vida em Portugal, no Século XIX*. Dissertação de Mestrado em Cuidados Paliativos, Universidade Católica do Porto. Portugal.
- Wade W. G. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69: 137–143. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.11.006.
- Wang, J.; Liu, L.; Georgescu, A.; Le, V. V.; Ota, M. H.; Tang, S.; Vanderbilt, M. 2017. Identifying ancient beer brewing through starch analysis: a methodology. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 15: 150–160. DOI: 10.1016/j.jasrep.2017.07.016.
- Weiss, E.; Kislev, M. E.; Simchoni, O.; Nadel, D. 2004. Small-grained wild grasses as staple food at the 23000-year-old site of Ohalo II, Israel. *Economic Botany*, 58(Suppl.): S125–S134. JSTOR: <https://www.jstor.org/stable/4256914?seq=1>.
- Weyrich, L. S.; Dobney, K.; Cooper, A. 2015. Ancient DNA analysis of dental calculus. *Journal of Human Evolution*, 79: 119–124. DOI: 10.1016/j.jhevol.2014.06.018.
- Yang, X.; Perry, L. 2013. Identification of ancient starch grains from the tribe Triticeae in the North China Plain. *Journal of Archaeological Science*, 40: 3170–3177. DOI: 10.1016/j.jas.2013.04.004.
- Zhang, P.; Whistler, R. L.; BeMiller, J. N.; Hamaker, B. R. 2005. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility — a review. *Carbohydrate Polymers*, 59: 443–458. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.10.014.

Anexo 1. Chave dicotômica para a determinação da coleção de amidos vegetais do Departamento de Ciências da Vida (Nota: as formas descritas referem-se, sempre, à observação em corte ótico).

1. Grãos de amido simples sempre < 9 mm*Oryza sativa* (arroz–*Poaceae*)
- Grãos de amido simples pelo menos em parte > 9 mm.....2
2. Hilo claramente excêntrico, conspícuo.....3
- Hilo, quando conspícuo, concêntrico ou só levemente excêntrico, ou inconspícuo..4
3. Grãos ovais, elípticos ou circulares em corte ótico, comprimento/largura sempre $< 1,4$ *Solanum tuberosum* (batateira–*Solanaceae*)
- Grãos quase sempre alongados, oblongos, aclavados, fusiformes ou elípticos de excentricidade elevada, comprimento/largura quase sempre $> 1,4$*Musa* (bananeira–*Musaceae*)
4. Grãos frequentemente compostos.....5
- Grãos simples ou só raramente compostos.....6
5. Pelo menos alguns grãos com a menor dimensão (largura) ≥ 26 mm...*Avena sativa* (aveia–*Poaceae*)
- Grãos sempre com a menor dimensão (largura) < 26 mm.....*Pisum sativum* (ervilha–*Fabaceae*)
6. Grãos quase sempre circulares.....*Prunus dulcis* (amendoeira–*Rosaceae*)
- Grãos, pelo menos em boa parte, com outras formas.....7
7. Grãos predominantemente poligonais.....*Panicum miliaceum* (milho-miúdo –*Poaceae*)
- Grãos diferentes ou, quando poligonais, também com outras formas em número significativo.....8
8. Hilo predominantemente estrelado.....*Zea mays* (milho–*Poaceae*)
- Hilo predominantemente com outras formas (punctiforme, alongado, alongado-ramificado nas extremidades) ou inconspícuo.....9
9. Grãos com comprimento ≤ 20 mm, raramente elíptico.....*Castanea sativa* (castanha–*Fagaceae*)
- Pelo menos alguns grãos com comprimento >20 mm, frequentemente elíptico.....10
10. Grãos não ou só raramente poligonais ou subpoligonais (*Fabaceae*).....11
- Grãos frequentemente poligonais ou subpoligonais.....13
11. Menos de 1/4 dos grãos maiores com comprimento ≥ 30 mm.....*Vicia faba* (fava–*Fabaceae*)
Pelo menos 1/4 dos grãos maiores com comprimento ≥ 30 mm.....12
12. Grãos com comprimento < 43 mm.....*Lens esculenta* (lentilha–*Fabaceae*)
- Pelo menos alguns grãos com comprimento ≥ 43 mm.....*Cicer arietinum* (grão-de-bico –*Fabaceae*)
ou *Phaseolus vulgaris* (feijão–*Fabaceae*)
13. Grãos medianamente variáveis em dimensões, com comprimento < 30 mm*Ipomoea batatas* (batata-doce–*Convolvulaceae*)
- Grãos muito variáveis em dimensões, pelo menos alguns com comprimento ≥ 30 mm (*Poaceae*).....14
14. Grãos com comprimento < 40 mm.....*Hordeum murinum* (cevada–*Fabaceae*)
Pelo menos alguns grãos com comprimento ≥ 40 mm.....*Secale cereale* (centeio–*Poaceae*) ou *Triticum aestivum* (trigo–*Poaceae*).

(Página deixada propositadamente em branco)