



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

GABRIEL AUGUSTO BARBOSA DE FREITAS FRAZÃO BITTENCOURT

AVALIAÇÃO DE PUTREFAÇÃO DE TECIDO SUÍNO NA MICOLOGIA FORENSE

BRASÍLIA
2021



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

GABRIEL AUGUSTO BARBOSA DE FREITAS FRAZÃO BITTENCOURT

AVALIAÇÃO DE PUTREFAÇÃO DE TECIDO SUÍNO NA MICOLOGIA FORENSE

Relatório final de pesquisa de iniciação científica
apresentado a Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa

Orientação: Professor Mestre Luís Eduardo
Santos Barros

BRASÍLIA
2021

AGRADECIMENTOS

Manifesto meus agradecimentos e reconhecimentos a todos os envolvidos direta e indiretamente para que esse trabalho fosse realizado da melhor forma possível. Os méritos recebidos por este trabalho compartilho com as pessoas aqui citadas.

Ao professor Dr. Paulo Queiroz, por ter incentivado o plaqueamento dos fungos em placa de petri e auxiliando na identificação da levedura, facilitando assim a obtenção dos resultados.

À professora Dr. Anabelle Azevedo, que foi a orientadora inicial, porém teve que se ausentar por questões pessoais, mas sempre auxiliou no que pôde durante a realização desse projeto.

À professora Dr. Fabíola Castro, que ajudou na identificação do fungo, servindo de auxílio nos resultados.

À minha colega de curso Poliana Rodrigues que auxiliou no desenvolvimento do trabalho como um todo.

RESUMO

A ciência forense é uma área que abrange os mais diversos conhecimentos utilizados para a resolução de intercorrências do âmbito criminal. Dentro dessa ciência houve o surgimento da Microbiologia Forense, que conta com os avanços da Biologia Molecular, para que possam ser investigados os microrganismos presentes nas cenas de crime. Um desses organismos estudados são os fungos, que são estudados na área de micologia forense, por conta de estarem envolvidos nos estágios de decomposição de cadáveres, pois os mesmos são uma grande fonte de sais para esses microrganismos. Por tratar-se de um campo de estudos relativamente novo, com aproximadamente 40 anos, ainda existem poucos artigos que abordam sobre esse assunto. Dito isso, a presente pesquisa teve como objetivo identificar quais os principais grupos fúngicos que acometem os tecidos de suínos em estado de putrefação no intervalo post mortem. Sendo realizada à luz da micologia forense. Trata-se de uma pesquisa que utiliza de experimento laboratorial, de aproximadamente dois meses e meio de prática. Como resultado da investigação, foi encontrado um fungo que apresenta traços de semelhança com *Candida spp.* um dos principais fungos ambientais envolvidos na putrefação no Brasil. Concluímos assim que é necessário mais pesquisas na área a fim de aumentar o banco de dados sobre fungos, dado que esses, juntamente com dados ambientais, tais como clima e umidade, auxiliam na obtenção de respostas em determinadas situações, principalmente artigos de produção nacional, devido a vasta diversidade de fungos e regiões do país. Contribuindo assim para a área de perícia criminal.

Palavras-chave: micologia forense; putrefação; fungo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
3. MÉTODO	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
APÊNDICE A – Figuras adicionais para o desenvolvimento do projeto	18
REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

A ciência forense é uma área que abrange diversos tipos de conhecimentos científicos ligados a análise de indicadores, com finalidades de esclarecer e auxiliar as investigações de cunho criminal. Sua criação ocorreu no final do século XIX, a partir da ideia de Hans Gross em utilizar a ciência moderna na resolução de casos criminais. A implementação de laboratórios policiais nos Estados Unidos, se deu por volta dos anos de 1920 e 1930. E, em 2006, a Universidade Lausanne na França abriu o Instituto de Polícia Científica (GARRIDO; GIOVANELLI, 2009).

O desenvolvimento de técnicas mais precisas e aumento de análises de microrganismos, devido ao ataque bioterrorista nos EUA em 2001, fez com que a Microbiologia Forense se tornasse mais significativa. É uma área que foi criada juntamente com o avanço das tecnologias de biologia molecular, avanços esses que permitiram a identificação humana, tais como fluidos corporais e estimativa de intervalo post mortem. Dentre as áreas da microbiologia estão a Bacteriologia, a Virologia e a Micologia. A Bacteriologia Forense é usada em casos, como por exemplo, de afogamentos, onde pode ser feito o isolamento de microrganismos bacterianos, e com isso, relacionar ao local e ao tipo da água (WEÇOSKI, 2020).

A Micologia Forense é a ciência que estuda como as espécies fúngicas estão relacionadas ao processo de decomposição cadavérica, já que este se torna uma fonte de matéria orgânica. Seus estudos se iniciaram em 1982 pelos belgas Voorde e Van Dijck, porém mesmo após quase 40 anos, existem poucos materiais científicos referentes as distintas temperaturas e umidades regionais, segundo Hawksworth e Wiltshire (COSTA, 2017). O seu principal reconhecimento internacional na comunidade científica de análise forense é por David L. Hawksworth e Patricia E.J. Wiltshire, que reafirmam a carência de mais dados na área, fazendo-se necessário a pesquisa em campo sobre a atividade fúngica em diversas regiões (HAWKSWORTH; WILTSHIRE, 2011).

Os fungos são seres eucariotos, unicelulares ou pluricelulares, imóveis, com parede celular de quitina, heterotróficos, com digestão extracorpórea, aeróbios ou anaeróbios facultativos e com reprodução assexuada ou sexuada. Sendo sua classificação macroscópica dividida em fungos filamentosos ou bolores, e microscópicas na forma vegetativa, de brotamento e pseudolinfas. Possuem uma ampla gama de aplicações como na decomposição de matéria orgânica, na produção

de alimentos/bebidas, etanol e medicamentos. Podem também causar doenças, alergias e pragas agrícolas, interferindo assim na saúde pública (OLIVEIRA, 2014).

A aplicação desses microrganismos na micologia forense é dada em alguns casos quando não é possível a utilização da entomologia, pois sem a colonização de insetos para a determinação do tempo de putrefação no intervalo post mortem (IPM) do corpo, torna-se necessário o seu uso. Além de ser utilizada para o tempo de morte, possui como outros papéis: investigar a causa da morte por envenenamento, prover evidências residuais, localizar corpos e indicar o tempo de deposição (RODRIGUES, 2014).

De acordo com Filho, 2008 os fungos anemófilos ambientais geralmente não causam sintomas nos seres humanos, entretanto por serem transmitidos pelo ar apoia a identificação dos microrganismos em cadáveres, todavia depende das condições ambientais como: temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica, pressão barométrica, nebulosidade, direção e velocidade do vento, irradiação solar e estação climática. Desta forma existem diversos fungos que variam de acordo com a região e conseqüentemente aumenta a quantidade de recursos para uma identificação mais específica na putrefação.

A putrefação é um processo onde a matéria orgânica se decompõe pela ação da fauna macroscópica, fazendo com volte a sua condição de matéria inorgânica. Dentre os principais fungos que estão presentes na decomposição orgânica estão os *Rophalomyces strangulatus*, que são do gênero Zygomycetos, a *Hebeloma vinosophyllum* e a *Laccaria amethystine*, que são Basidiomicetos, o *Ascobolus denudatos* e o *Coprinus neolagopus*, que são Ascomycetos. Estes fungos, quando associados a outros elementos, auxiliam na determinação do intervalo post mortem. Dentro das Ascomycetas tem também a *Asthrographis sp*, uma levedura que pode se desenvolver no material cadavérico exposto em ambiente de floresta por conta da sua ampla distribuição no solo e no ar. Outra levedura presente nos estágios cadavéricos é a *Candida lipolytica*, que é caracterizada por ser um organismo onipresente, fazendo com que seja possível ser isolada em uma grande diversidade de resíduos, como materiais de agricultura, plantas, solo, carnes refrigeradas e entre outros (BARBOSA *et al.*, 2012; RODRIGUES, 2014).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho é identificar quais os principais grupos fúngicos que acometem os tecidos de suínos em estado de putrefação no intervalo post mortem.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Hawkworth e Wiltshire, 2011 dizem que o processo de decomposição tem início no momento em que a circulação sanguínea é interrompida devido alguma causa sistêmica. Logo após 24-36 horas, as bactérias alojadas no intestino e trato respiratório começam a invadir os tecidos ao seu redor e a digerir-los. Essa primeira fase é chamada de fase de coloração onde a atividade bacteriana da *Clostridium welchii* aumenta formando metano, gás carbônico, amônia, mercaptanos e gás sulfídrico para a quimiossíntese de energia. Com a elevação do gás sulfídrico e a ligação com a hemoglobina forma-se a sulfohemoglobina, levando ao escurecimento do corpo. Sendo que no primeiro dia pós morte do indivíduo, também é possível verificar a presença de artrópodes, como moscas, formigas e alguns besouros sobre o cadáver (COSTA *et al.*, 2016)

O resultado deste processo após 48 até 72 horas é o inchaço do corpo devido a produção e acúmulo de gases pelas bactérias saprófilas nas cavidades corporais. Esse estado é chamado de fase gasosa, devido a característica descrita anteriormente. A decomposição proteica é prosseguida o que libera compostos nitrogenados como a ptomaínas ocasionando um odor desagradável (COSTA, 2017).

Após o início do processo de decomposição, ocorre a fase coliquativa, onde as larvas dos artrópodes começam a penetrar em diferentes orifícios e cavidades, liberando os gases resultantes da decomposição bacteriana. Os quais atraem animais devido ao forte odor, principalmente necrófagos, acelerando o processo de putrefação. Ademais, com a escassez dos recursos resultantes da decomposição, o odor diminui, e as espécies invasoras também vão diminuindo até chegar a fase de esqueletização (TRANCHIDA *et al.*, 2014).

A ocorrência do processo de decomposição é de extrema importância para qualquer ecossistema, necessário para o equilíbrio ecológico. Possibilitando o ciclo do carbono, enriquecendo o solo para o crescimento de matéria vegetal. Todo este processo deve-se diretamente aos principais decompositores: as bactérias e os fungos. Atualmente existe uma diversidade considerável de fungos atuando nesse ciclo como os Zigomicetos, os Basidiomicetos e os Ascomicetos, porém os prevalentes no Brasil são as espécies: *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.* e *Candida spp.*, devido ao clima tropical que se estende pelo país (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2014; HAWKSWORTH; WILTSHIRE, 2011).

Dentre os fungos encontrados no intervalo post mortem estão os Zigomicetos que são fungos terrestres que possuem atividades saprófitas e se reproduzem de maneira assexuada

por meio da formação de esporângios e esporangíolos ou de maneira sexuada por zigósporos. O *Rophalomyces strangulatus* é um exemplo de fungo dentro dessa divisão (NOVO, 2017).

Os Basidiomicetos se diferem de outros fungos, por conta da sua produção de basidiósporos, que são formados a partir do basídio, uma estrutura esporífera. São exemplos de Basidiomicetos a *Hebeloma vinosophyllum* e a *Laccaria amethystine* (TRANCHIDA *et al.*, 2014).

Os Ascomicetos são o grupo mais numeroso dentre os fungos, contendo em torno de 60.000 espécies, possui um habitat variável, podendo ir de saprofitismo ao parasitismo. Os fungos desse gênero que são encontrados nos estágios cadavéricos são os *Ascobolus denudatos* e o *Coprinus neolagopus* (NOVO, 2017).

O *Aspergillus flavus* é uma espécie de fungo filamentosos comum em todo o planeta: no solo, água e ar. Ele é periodicamente em amendoim e pode produzir aflatoxinas e ácido ciclopiazônico causando um efeito tóxico no organismo do ser humano. Apresenta como principais características um talo filamentosos, feito por hifas septadas e assexuadas, colônias com cor inicialmente branca, com o amadurecimento, tornam-se verdes, amarelas, castanhas ou pretas (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2014).

Já os *Penicillium sp.* são fungos conidiais e sapróbios, se apresentam comumente na forma de mofos e bolores. São utilizados também na indústria alimentícia para a fabricação de queijos e vinhos, mas seu principal uso, e grande descoberta em relação ao fungo foi a produção de micotoxina, utilizada na fabricação de penicilina, que tem a capacidade de destruir algumas espécies de bactérias (GONÇALEZ *et al.*, 2013).

E as *Candida sp.* que são leveduras que vivem em diploidia, comum em organismos e é um aeróbio obrigatório, crescendo em meios com variação de pH e temperatura. Por isso, quando ocorre o comprometimento do sistema imune, elas geralmente se tornam as primeiras colônias fúngicas a aparecerem em cadáveres e podem apresentar crescimento polimórfico em diferentes ambientes (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2014).

Para o perito criminal, o conhecimento de cada um desses microrganismos na micologia, em conjunto com outras áreas, torna-se essencial para a obtenção dos resultados utilizados em um espectro judicial. Assim fornecendo dados como: tempo da morte, local e provas residuais do mesmo (HAWKSWORTH; WILTSHIRE, 2011).

3. MÉTODO

O presente estudo foi um experimento laboratorial, durante o período de aproximadamente dois meses e meio de prática. A equipe de pesquisadores foram os orientadores, Annabelle Azevedo e Luiz Eduardo, com a prática realizada pelo aluno Gabriel Augusto e a parte teórica pela aluna Poliana Rodrigues. A organização foi baseada no tempo de cada resultado e em referências bibliográficas pesquisadas, sendo o objeto de estudo o fungo.

Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o assunto, de Outubro de 2020 a Janeiro de 2021. Após esse período foram realizadas pesquisas sobre o material que seria mais conveniente dentro do orçamento, no período de Fevereiro a Maio de 2021. Ao encontrar o material, uma fissura de carne suína de 1 kg de um porco que cresceu em ambiente livre e já ia ser abatido independentemente deste projeto. Transportou-se ao CEUB, para a área do Labocien e deixado na área externa do bloco 10, nos meses de Junho e Julho de 2021.

A amostra foi colocada em um aquário onde foi isolada com telas e fitas para evitar que animais externos interferissem e em seguida foram executadas verificações ao longo de 1 mês, toda sexta feira as dezesseis horas. Na primeira semana foi observado o crescimento de fungos no material. Durante a segunda e a terceira semana houve o aparecimento de moscas e larvas. Após a quarta semana a carne já havia apodrecido por completo.

Foi coletada uma amostra do fungo crescido com uma alça descartável e a mesma foi cultivada em duplicada em um meio Sabouraud com cloranfenicol durante uma semana e meia, uma duplicada em temperatura ambiente e a outra na estufa com a temperatura de 37°C. Após o crescimento foi produzida uma lâmina contendo uma amostra da colônia e esta foi corada por 5 minutos com azul de metileno para se realizar a visualização microscópica.

Para a verificação do crescimento da colônia foi feita o plaqueamento em placa de petri no meio YG. Para a preparação do meio utilizou: 2,5g de extrato de levedura, 5g de glicose, 200ml de água destilada e 2,5g de ágar que foram homogeneizados em um erlenmeyer por meio de uma bailarina. Em seguida foi verificado o pH, que estava em aproximadamente 7,2 e desta forma a mistura foi aquecida para melhor homogeneização. Imediatamente a abertura do frasco foi fechada e o mesmo foi para a autoclave. Enquanto

isso foi ligado o ultravioleta da capela para a esterilização da placa de petri. Após autoclavar, foi esperado a mistura esfriar e o meio foi colocado na placa de petri, aguardando sua solidificação. Logo o meio foi isolado com papel filme, identificado e levado à estufa com a temperatura de 28°C por três dias para verificar se estava estéril.

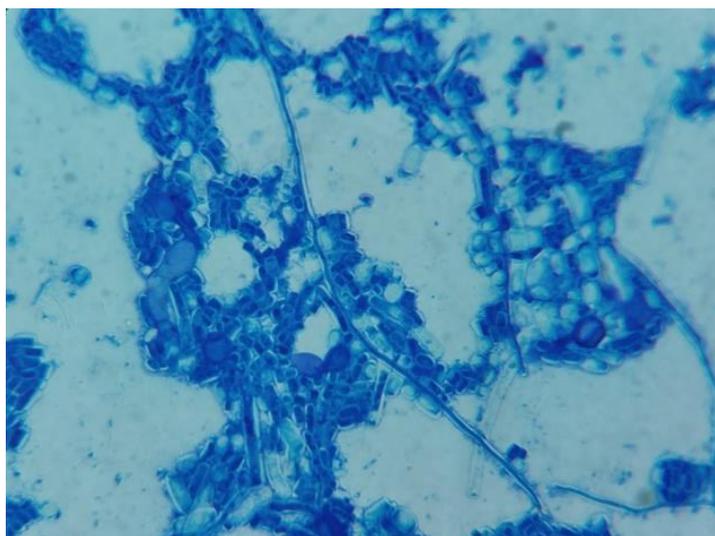
A cultura que havia crescido no ágar Sabouraud foi cultivada em triplicata no meio YG durante uma semana e meia, sendo três em temperatura ambiente e três na estufa a 37°C. Após esse período foi verificado como foi o crescimento da colônia e foi produzida uma lâmina com a amostra deste ágar onde foi corado com a mesma técnica anteriormente.

Durante todo o procedimento foram utilizados meios estéreis, e os resultados distinguidos de acordo com a bibliografia. A reunião dessas informações foi feita pelo programa Microsoft Word® versão 2019. Os dados obtidos foram a partir de 2009, nos idiomas português e inglês. As bases de dados utilizados incluíram: Biblioteca Virtual de Saúde (BVS) e PubMed, por meio das palavras-chave: micologia forense, putrefação, fungo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

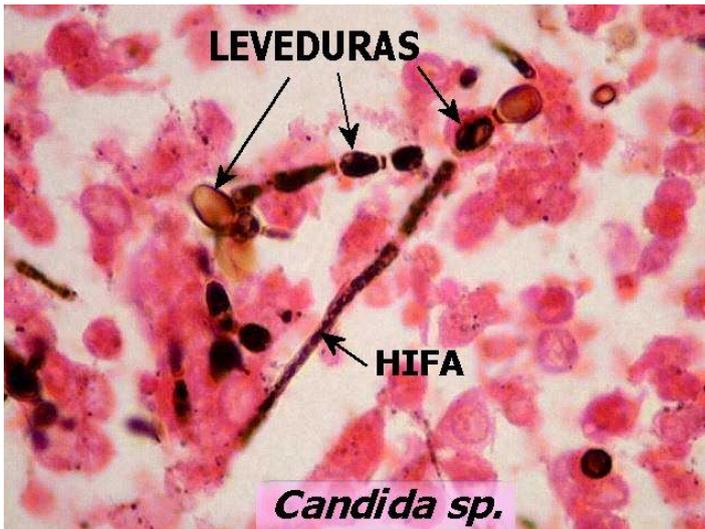
De acordo com Rodrigues, 2014, os principais fungos ambientais envolvidos na putrefação no Brasil são: *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.* e *Candida spp.*, baseado nesses dados e condições climáticas, foi comparado imagens do microrganismo obtidas na figura 1 no laboratório. O fungo mais próximo do resultado na microscopia, quando comparado com a figura 2 da UNICAMP levanta a suspeita de ser uma *Candida spp.*, devido a presença de leveduras e hifas dispostas de forma semelhante, além de exercer a mesma função pesquisada.

Figura 1: Visualização microscópica da amostra cultivada em meio Sabouraud da fissura de carne suína



Fonte: Próprio autor, 2021.

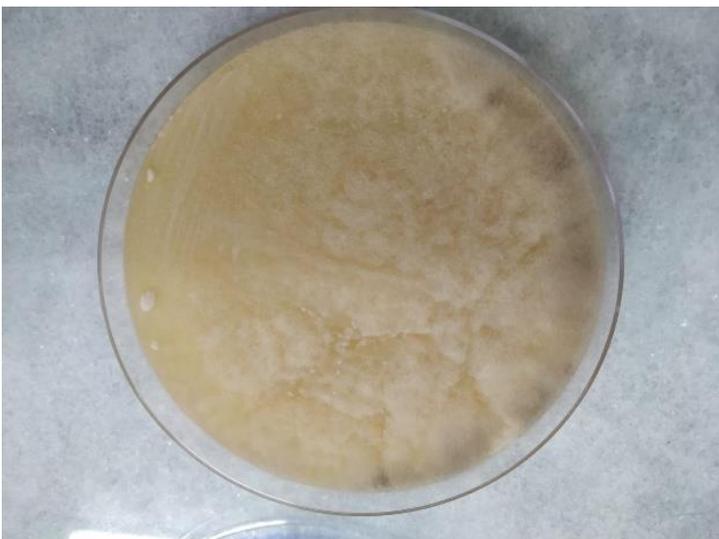
Figura 2: Microabscessos renais por *Candida*



Fonte: UNICAMP, 2021

Ao observar o plaqueamento da colônia crescida na figura 3, é verificado uma coloração creme, levemente enrugada e com textura cotonosa e, ao compará-la com a figura 4, uma cultura com mesmas características, é visto uma semelhança que reafirma a suspeita de *Candida spp.* A diferença de textura deve-se ao fato da incubação da figura 3 ser realizada a temperatura ambiente, enquanto a figura 4 ser incubada na estufa.

Figura 3: Plaqueamento em placa de petri no meio sólido YG a partir da cultura no meio Sabouraud com cloranfenicol.



Fonte: Próprio autor, 2021.

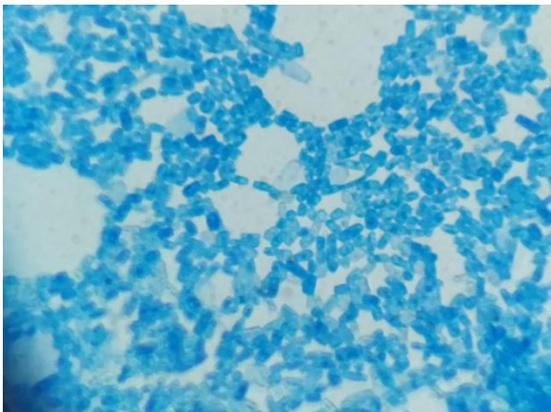
Figura 4: *Cândida auris*.



Fonte: G1, 2019.

Para verificar se o microrganismo que se desenvolveu na placa de petri era compatível com a amostra cultivada em ágar Saboraud com cloranfenicol, foi produzida uma lâmina como demonstrado na figura 5. Apesar de não apresentar a estrutura de hifas, pode-se observar as características de leveduras o qual corrobora com o resultado da figura 1.

Figura 5: Visualização microscópica da amostra cultivada em placa de petri.



Fonte: Próprio autor, 2021.

O fungo observado possui grande suspeita de ser uma *Candida spp.*, porém não se pode confirmar, porque a análise dos fungos não depende apenas de visualização microscópica e macroscópica, mas também de técnicas de biologia molecular como PCR, para avaliar seu material genético, assim obtendo um resultado mais preciso. Dessa forma levanta-

se apenas uma suspeita do seu provável resultado, visto que os testes confirmatórios são muito caros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos são de extrema importância para a Micologia Forense, porque auxiliam nas investigações de mortes, tornando possível saber o intervalo post mortem. Os mesmos estão presentes no processo de putrefação, promovendo a degradação do material orgânico e retorno de nutrientes para o ambiente. A falta de informações sobre a identificação micológica, é algo que pode dificultar os avanços científicos criminais, pois esses dados facilitam o entendimento de um caso, principalmente quando relacionados a diferentes variáveis e aos dados ambientais.

APÊNDICE A – Figuras adicionais para o desenvolvimento do projeto

Figura 1: Fissura de carne suína antes de ser isolada.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Figura 2: Fissura de carne suína isolada.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Figura 3: Fissura de carne suína após uma semana ao ar livre (aparecimento de fungos).



Fonte: Próprio autor, 2021.

Figura 4: Fissura de carne suína após três semanas ao ar livre (aparecimento de larvas).



Fonte: Próprio autor, 2021.

REFERÊNCIAS

BBC NEWS. **Candida auris: o mapa que mostra avanço no mundo de fungo resistente**. 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/bemestar/noticia/2019/08/22/candida-auris-o-mapa-que-mostra-avanco-no-mundo-de-fungo-resistente.ghtml>. Acesso em: 13 ago. 2021.

CARTER, David O.; TIBBETT, Mark. Taphonomic Mycota: fungi with forensic potential. **Journal Of Forensic Sciences**, v. 48, n. 1, 1 jan. 2003. [Http://dx.doi.org/10.1520/jfs2002169](http://dx.doi.org/10.1520/jfs2002169).

COSTA, Francislaide da Silva. **Aplicações da micologia forense no âmbito criminal: uma revisão bibliográfica**. Manaus, 2017.

COSTA, Alexandra Machado *et al.* **MICROBIOLOGIA FORENSE**. São Paulo, 2016. 26 slides, color.

FILHO, Renato Evando Moreira. **Micologia Forense: A dinâmica da Microbiota Fúngica na investigação do período Post Mortem**. 2008. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Escola Politécnica de saúde Joaquim Venâncio. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: IOC, 2014 v. 4, p. 399-496.

GARRIDO, Rodrigo Grazinoli; GIOVANELLI, Alexandre. **Criminalística: origens, evolução e descaminhos**. 2009.

GONÇALEZ, Edlayne *et al.* Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Toxicology/ Scientific Article**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 312-317, 8 ago. 2013

HAWKSWORTH, D. L.; WILTSHIRE, P. E. J. Forensic mycology: current perspectives. *Res Rep Forensic Med Sci*, 2015. **Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations**. *Forensic science international*, v. 206, n. 1, p. 1-11, 2011..

OLIVEIRA, Jeferson Carvalhaes de. **Tópicos em Micologia Médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Control-Lab, 2014.

RODRIGUES, Tabata Burkhart. **Avaliação da sucessão fúngica em carcaça de suíno (SUS scrofa L.) para a determinação de intervalo post mortem**. Florianópolis, 2014.

SOUSDALEFF, Martha. **CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS DE AR INDOOR E AR OUTDOOR DOS LABORATÓRIOS DA UTFPR CAMPUS CAMPO MOURÃO/PR**. 2016. 81 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.

TRANCHIDA, María C. *et al.* Soil Fungi: their potential use as a forensic tool. **Journal Of Forensic Sciences**, v. 59, n. 3, p. 785-789, 6 fev. 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/1556-4029.12391>.

UNICAMP. **Microabscessos renais por Candida.** 2021. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/laminfl33.html>. Acesso em: 13 ago. 2021.

WEÇOSKI, Déborah Aline Diniz. **MICROBIOLOGIA FORENSE: UMA REVISÃO.** 2020. 50 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.