

**CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADA  
CURSO DE BIOMEDICINA**

**BEATRIZ TASSO FABRI DE JESUS**

**MICROBIOLOGIA APLICADA À MEDICINA FORENSE**

**SANTOS (SP)  
2023**

**BEATRIZ TASSO FABRI DE JESUS**

**MICROBIOLOGIA APLICADA À MEDICINA FORENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso desenvolvido no Curso de Biomedicina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação do/a Professor/a Doutora Daniela de Pita Pereira, no Centro Universitário Lusíada.

**SANTOS (SP)**

**2023**

**BEATRIZ TASSO FABRI DE JESUS**

**MICROBIOLOGIA APLICADA À MEDICINA FORENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso desenvolvido no Curso de Biomedicina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação do/a Professor/a Doutora Daniela de Pita Pereira, no Centro Universitário Lusíada.

**DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_**

**PROFA. DRA. DANIELA DE PITA PEREIRA  
ORIENTADOR/A DO TCC**

**PROF/A DR. LUIZ HENRIQUE GAGLIANE  
PROFESSOR/A CONVIDADO/A**

**PROF/A DR. GUSTAVO POTASSIO PACHECO DE JESUS  
PROFESSOR/A CONVIDADO/A**

**SANTOS (SP)  
2023**

Dedico este trabalho ao meu tio Jaime Tasso e meu sobrinho Bernardo Tasso; que se orgulhou e que se orgulhará de minha pessoa, respectivamente.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer as seguintes pessoas:

Meus pais, que sempre batalharam por meus estudos, me incentivaram em todos os momentos e nunca permitiram que algo faltasse em minha vida. Minha família de forma geral, mas também à minha irmã e meu cunhado que me proporcionaram apoio nos momentos difíceis.

Minha professora Dra. Daniela de Pita Pereira que me orientou e me acompanhou no decorrer desse ano, sempre empenhada à arte da pesquisa.

Meus amigos Matheus Dinelli, Beatriz Marques, Manuela Bianchini e Laura Cruz que em nenhum momento me deixaram desistir da graduação e estiveram ao meu lado durante esses anos oferecendo todo suporte que um amigo poderia oferecer, e colegas de turma que tornaram essa jornada mais fácil de alguma forma, seja com risadas ou horas de estudo sem fim.

Meus melhores amigos Brenno Henrique, Ingrid Mayara e Thalia Serrano por sempre acreditarem no meu potencial, dividirem dores e sorrisos. Amizades que tornam a vida mais leve e fácil, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Meus cantores favoritos Camila Cabello, Justin Bieber e Katy Perry que, por meio de suas músicas trouxeram acalento à alma, inspiração e motivação em todos os momentos de minha vida.

Professores e biomédicos que, com afincos, ensinaram-me o respeito, amizade, carinho e amor pela biomedicina, além do conteúdo programado.

Ao Centro Universitário de forma geral, desde a reitoria até a equipe de limpeza sempre nos ajudaram com simpatia e alegria.

Por fim, a todos que fizeram parte dessa jornada. Nascer, viver e no Santos morrer é um orgulho que nem todos podem ter. Hala Madrid y nada más! DOIAQUIJE!

“Ao verme que primeiro roeu as frias carnes do meu cadáver dedico com saudosa lembrança estas memórias póstumas” (ASSIS, Machado de, 1881).

## RESUMO

A investigação forense desempenha um papel crucial na elucidação de circunstâncias de morte, identificação de vítimas desconhecidas e determinação do intervalo *postmortem* (IPM). O IPM, que representa o período decorrido desde a morte até a descoberta do corpo, é uma informação fundamental em investigações criminais, processos legais e na condução de autópsias. Estimar o IPM com precisão é um desafio complexo devido à influência de variáveis como temperatura ambiente, umidade, causa da morte e outros fatores. No entanto, nos últimos anos, a microbiologia aplicada à medicina forense emergiu como uma ferramenta promissora na busca por estimativas mais precisas e confiáveis do IPM. Neste cenário, o estudo teve como objetivo revisar o papel da microbiologia como metodologia para determinar o intervalo *Postmortem* (IPM), através de levantamento bibliográfico em base de dados como google acadêmico, Pubmed e Scielo. Bactérias e fungos, em conjunto a métodos macroscópicos já utilizados, podem ser utilizados como biomarcadores para concluir com maior precisão a estimativa do IPM, já que foram encontrados fungos como *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Mucor* spp, *Acremonium* spp, *Trichoderma* spp e *Fusarium* spp, e bactérias como *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp em diferentes estágios de decomposição do corpo humano. Entretanto por ser um método tardio, dentro de uma rotina não seria a primeira escolha mesmo que seja um método para maior precisão. Quando aplicado a casos específicos, se torna uma ferramenta valiosa em conjunto a outras para determinação da estimativa do Intervalo de Submersão *Postmortem* (PMSI).

**Palavras-chave:** *postmortem*, microrganismos, forense e microbiologia.

## ABSTRACT

Forensic investigation plays a crucial role in elucidating the circumstances of death, identifying unknown victims, and determining the *postmortem* interval (PMI). The PMI, which represents the period elapsed from death to the discovery of the body, is fundamental information in criminal investigations, legal proceedings and in conducting autopsies. Estimating the MPI accurately is a complex challenge due to the influence of variables such as ambient temperature, humidity, cause of death and other factors. However, in recent years, microbiology applied to forensic medicine has emerged as a promising tool in the search for more accurate and reliable MPI estimates. Against this backdrop, the study aimed to review the role of microbiology as a methodology for determining the *Postmortem* Interval (PMI), through a bibliographic survey of databases such as Google Scholar, Pubmed and Scielo. Bacteria and fungi, in conjunction with macroscopic methods already in use, can be used as biomarkers to conclude with greater precision the estimation of MPI, since fungi such as *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Mucor spp*, *Acremonium spp*, *Trichoderma spp* and *Fusarium spp*, and bacteria such as *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.* were found at different stages of decomposition of the human body. However, as it is a late method, it would not be the first choice in a routine, even if it is a method of greater precision. When applied to specific cases, it becomes a valuable tool in conjunction with others for determining the estimated Postmortem Submersion Interval (PMSI).

**Keywords:** *postmortem*, microorganisms, forensics and microbiology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Aula de anatomica com o Dr. Nicolaes Tulp (Rembrandt Harmenszoon van Rjin)

**Figura 2** – Mancha abdominal verde manifestada nas alterações iniciais da decomposição (Presnell e Denton)

**Figura 3** – Corpo na fase gasosa da decomposição (GALVÃO, Malthus)

**Figura 4** – Decomposição é um processo de autólise e putrefação (Presnell e Denton)

**Figura 5** – Esqueleto de um homem adulto (Presnell e Denton)

**Figura 6** – *Rigor Mortis* (Presnell e Denton)

**Figura 7** – *Livor Mortis* na posição anterior (Presnell e Denton)

**Figura 8** – *Livor Mortis* na posição posterior (Presnell e Denton)

**Figura 9** – Cadáver de porco em cada estado de decomposição (DICKSON, Gemma)

## LISTA DE GRÁFICO

**Gráfico 1** – Sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas no período gasoso (Filho et al)

**Gráfico 2** – Sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados no período gasoso (Filho et al.)

**Gráfico 3** – Sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas no período coliquativo (Filho et al.)

**Gráfico 4** – Sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados no período coliquativo (Filho et al.)

**Gráfico 5** – Sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas no período de esqueletização (Filho et al.)

**Gráfico 6** – Sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados no período da esqueletização (Filho et al.)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IPM	Intervalo <i>Postmortem</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMSI	Intervalo de Submersão <i>Postmortem</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>14</b>
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 TANATOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 DECOMPOSIÇÃO DO CORPO HUMANO APÓS A MORTE .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 MÉTODOS MACROSCOPIOS PARA ESTIMAR O INTERVALO POSTMORTEM .....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 MICROBIOLOGIA FORENSE .....</b>	<b>21</b>
<b>4.4.1 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DA DECOMPOSIÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>4.4.2 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4.3 PRINCIPAIS POSSÍVEIS MICRORGANISMOS UTILIZADOS COMO BIOMARCADORES .....</b>	<b>24</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>32</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Medicina Legal é uma especialidade médica que se concentra na aplicação dos princípios médicos à resolução de questões legais. Ela desempenha um papel fundamental no sistema de justiça, ajudando a esclarecer questões médicas e legais em casos judiciais e investigações criminais. O IPM, que é o período entre a morte de uma pessoa e a descoberta de seu corpo ou a realização da análise laboratorial, depende de uma série de fatores. Alguns desses fatores incluem a temperatura do ambiente, o grau de autólise, a interferência de insetos presentes na área onde o corpo foi encontrado e o papel de bactérias e fungos que desempenham um papel direto na decomposição do corpo humano. A observação macroscópica das reações causadas por estes microrganismos, que envolve a análise visual do corpo, é uma parte fundamental desse processo. Ainda que possua grande importância na perícia médico-legal, a literatura que aborda a Microbiologia como ferramenta para estimativa do IPM é restrita, tendo a abordagem macro um papel central neste cenário.

Porém recentemente, a Microbiologia Forense emergiu como uma ferramenta valiosa para estimar o IPM com maior precisão. Ela se concentra na identificação e diferenciação de fungos e bactérias presentes no corpo ou no ambiente ao redor. Essa abordagem complementa os métodos tradicionais usados na Medicina Legal e tem o potencial de fornecer estimativas mais precisas do momento do óbito. Em suma, a Medicina Legal desempenha um papel multifacetado na aplicação dos princípios médicos à resolução de questões legais, sendo o estudo do IPM e a integração da Microbiologia Forense alguns dos campos inovadores que ampliam seu alcance e aprimoram sua capacidade de esclarecer eventos complexos envolvendo a morte de indivíduos. Todavia, o material especializado ainda é escasso e se faz necessário mais estudos aprofundados na Microbiologia com um papel essencial dentro da perícia médico-legal.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Revisar o papel da microbiologia comometodologia para determinar o intervalo *Postmortem* (IPM).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Apresentar a tanatologia e os exames *postmortem* microbiológicos;  
Conceituar a microbiologia forense e as técnicas microbiológicas envolvidas;  
Descrever os principais marcadores microbiológicos e suas possíveis aplicações;

### **3 METODOLOGIA**

Como metodologia, o presente trabalho teve como base artigos, livros, dissertações e teses acerca do tema apresentado, através de levantamento bibliográfico em base de dados como google acadêmico, Pubmed e Scielo.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 TANATOLOGIA

Tanatologia é o estudo científico da morte, do morrer e dos processos que os envolvem. A palavra “tanatologia” é derivada das palavras gregas “thanatos”, que significa morte, e “logos”, que significa o estudo de. Este estudo contém uma abordagem multidisciplinar, que se baseia em vários campos, como medicina, psicologia, sociologia, antropologia, filosofia e espiritualidade (Figura 1). Seu principal objetivo é entender os aspectos físicos, psicológicos, sociais e espirituais da morte e seu impacto sobre os indivíduos e as comunidades.

**Figura 1** – Aula de anatomica com o Dr. Nicolaes Tulp



Fonte: Rjin, Rembrandt, 1632

### 4.2 DECOMPOSIÇÃO DO CORPO HUMANO APÓS A MORTE

Os estágios de decomposição do corpo humano após a morte podem variar dependendo de alguns fatores como temperatura, umidade, atividade microbiana, presença de necrófagos, condições de sepultamento e fatores individuais que afetam o processo de decomposição. (Dror et al., 2019; Johnson et al., 2021).

O estágio fresco, também conhecido como a fase de putrefação cromática, é a fase inicial da decomposição. Esta fase se concentra nas mudanças imediatas que ocorrem dentro do período de 24 a 36 horas após a morte. Durante esse estágio, as células do corpo ainda estão metabolicamente ativas. O corpo parece intacto, embora

a cor da pele possa ficar pálida ou azulada (*pallor mortis*). O *rigor mortis*, o enrijecimento dos músculos, geralmente se instala algumas horas após a morte. Ela também explora os efeitos da autólise e da putrefação, que levam ao início da decomposição. Esse estágio é caracterizado pela decomposição da matéria orgânica, principalmente devido à atividade de bactérias no trato gastrointestinal resultando em acúmulo de gases (Franceschetti et al., 2023). Com o acúmulo de gases, o corpo começa a inchar e a pele pode assumir uma coloração esverdeada, tendo início na pele da fossa ilíaca direita a mancha verde abdominal (Figura 2), devido à presença de sulfometahemoglobina, onde nos recém-nascidos e nos afogados, a mancha verde é torácica e não abdominal. Há também processos de marmoreio, formação de adipócitos e liberação de gases como sulfeto de hidrogênio e metano, produção de hidreto de enxofre. (García-Ruiz et al., 2018).

**Figura 2** – Mancha abdominal verde manifestada nas alterações iniciais da decomposição



**Fonte:** Presnell e Denton, 2015

Na segunda fase, começa a putrefação gasosa, que pode começar alguns dias após a morte e leva de 36 a 72 horas, o corpo passa por uma rápida decomposição e se torna inchado em todas as regiões (Figura 3), esta decomposição acelerada dos órgãos, a liquefação dos tecidos e a liberação contínua de gases nocivos. A liquefação dos tecidos e órgãos leva à liberação de fluidos e à produção de odores fortes. A aparência do corpo fica descolorida e marmorizada, com a pele assumindo uma tonalidade negra. O abdome pode se romper devido à pressão do gás, liberando fluidos de decomposição (Vass et al., 2018). Ocorre a fermentação butírica onde há conversão de ácidos graxos em ácido butírico e outros compostos voláteis, causado pela quebra de tecidos gordurosos, que é caracterizada pelo forte odor (Dror et al., 2019).

**Figura 3** – Corpo na fase gasosa da decomposição.



**Fonte:** Galvão Malthus, 2023

A putrefação coliquativa ocorre 72 horas após a morte. Os restos mortais tornam-se esqueléticos à medida que os tecidos moles, incluindo músculos, ligamentos e órgãos, se decompõem mostrando que a decomposição é um processo de autólise e putrefação (Figura 4). Os ossos ficam expostos e o corpo perde massa gradualmente (Fiedler et al., 2021). No estágio final da decomposição envolve a transformação de tecidos moles em restos esqueléticos, restam apenas restos secos do esqueleto, onde o corpo fica dessecado devido à ausência de umidade. Dependendo do ambiente, esse estágio pode levar de meses a anos para ser concluído. Os ossos restantes podem acabar se dispersando (Figura 5) ou se desintegrando devido a fatores ambientais (Dror et al., 2019).

**Figura 4** – Decomposição é um processo de autólise e putrefação



**Fonte:** Presnell e Denton, 2015

**Figura 5** – Esqueleto de um homem adulto



**Fonte:** Presnell e Denton, 2015

### 4.3 MÉTODOS MACROSCÓPIOS PARA ESTIMAR O INTERVALO POSTMORTEM

O IPM é definido por um conjunto de métodos que em sua grande maioria são métodos macroscópicos e mais rápidos do que o método microbiológico. Dentro desses métodos macroscópicos, temos como exemplo o *Rigor mortis*, *Livor Mortis*, *Algor Mortis* e Entomologia Forense.

O *Rigor Mortis* (Figura 6) é a rigidez temporária dos músculos que ocorre após a morte. Ela tem seu início após a morte e desaparece dentro de 24 – 48 horas, pode ser desenvolvido rapidamente se o corpo estiver acidótico no momento da morte, por estar relacionado com a diminuição de pH no miócitos (PRESNELL e DENTON, 2015).

**Figura 6 – Rigor Mortis**



**Fonte:** Presnell e Denton, 2015

O *Livor mortis* refere-se à descoloração de algumas partes do corpo. Após a morte, a pressão intravascular cai à zero, então o sangue é afetado pela gravidade e começa a migrar para as partes mais baixas do corpo, assim como as partes mais elevadas vão perdendo o sangue e ganhando pequenas manchas isoladas com uma tonalidade cinza (Figuras 7 e 8). Essas manchas tendem aumentar seu tamanho e espalhar pelas

áreas com maior declive do cadáver. Caso o cadáver tenha sido de uma pessoa com anemias severa ou que tenha perdido uma perda considerável de sangue, o livor será mais discreto (GONÇALVES, 2019).

**Figura 7 – *Livor Mortis* na posição anterior**



**Fonte:** Presnell e Denton, 2015

**Figura 8 – *Livor Mortis* na posição posterior**



**Fonte:** Presnell e Denton, 2015

#### **4.4 MICROBIOLOGIA FORENSE**

A microbiologia forense é uma área especializada dentro da ciência forense que busca empregar os princípios da microbiologia para investigar e resolver questões legais, tendo concentração na análise de microrganismos, para obtenção de maior compreensão dentro de contextos criminais, ambientais e de saúde pública.

Dentro do campo da microbiologia forense, várias aplicações essenciais surgem: Primeiro essa disciplina é fundamental para identificação de microrganismos em cenas de crimes, uma vez que encontrados nos mais diversos lugares, certamente estão presentes em qualquer habitat relevante para o ser humano e estando presente em amostras de fluidos corporais, podendo ser coletados e analisados, fornecendo evidências cruciais para relacionar indivíduos e lugares específicos para determinado crime. Ademais a análise de microrganismos exerce papel fundamental, pois muitos deles possuem capacidade para se adaptar ao meio ambiente, alterando suas estruturas para melhorar sua sobrevivência em determinados meios, possibilitando que perfis isolados de vários substratos assumam status de potenciais “indicadores forenses” indicando origem geográfica e presença de pessoas em locais (Tambuzzil et al., 2023).

Em situações de bioterrorismo suspeito, essa disciplina torna-se uma ferramenta vital. Há possibilidade de auxiliar na identificação de agentes patogênicos utilizados em ataques biológicos, bem como rastrear a origem de tais agentes, contribuindo para resolução de casos. O diagnóstico laboratorial para identificar os agentes patogênicos pode ser realizado pela demonstração do agente diretamente nos materiais coletados do paciente, por microscopia fotônica, por métodos imunológicos específicos (como o ELISA) e por métodos moleculares. A bactéria pode ainda ser cultivada a partir desses mesmos materiais e anticorpos no sangue do paciente a confirmar o diagnóstico. Outrossim, a análise ambiental pode ser empregada para determinação de fonte de contaminação em cenários de poluição (Schatmayr; Barth, 2013).

#### 4.4.1 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DA DECOMPOSIÇÃO

Dentro do processo de decomposição do corpo humano podemos encontrar diversos grupos de microrganismos presentes que desempenham importantes papéis dentro deste processo que ocorre em diversas etapas.

1. Bactérias Aeróbicas e Anaeróbicas: As bactérias são os primeiros microrganismos a colonizar o corpo após a morte. As bactérias aeróbicas começam a proliferar nas áreas expostas do corpo, enquanto as bactérias anaeróbicas se desenvolvem em áreas menos expostas e em algumas feridas. Há uma quebra de tecidos e liberação de gases e líquidos causados pela presença das bactérias;
2. Fungos: Os fungos, normalmente, são responsáveis pelo aparecimento de manchas coloridas no corpo, como bolor verde que pode ser encontrado em áreas úmidas e expostas. *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Mucor* spp são exemplos de fungos encontrados nos estágios da decomposição;
3. Bactérias de Putrefação: À medida que o processo da decomposição avança, bactérias específicas contribuem para liberação de gases, como o gás sulfídrico. As bactérias encontradas em grandes quantidades são os *Flavobacterium* spp. e *Lactobacillus*;
4. Microrganismos Produtores de Gás: Alguns microrganismos anaeróbicos produzem gases como o dióxido de carbono e o gás metano durante o processo de decomposição;

#### **4.4.2 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS**

O processo de identificação de um microrganismo é essencial para saber qual tratamento e qual ação tomar mediante ao microrganismo identificado, sendo que existem diversos métodos tanto para bactérias, quanto para fungos.

Para identificação de bactérias, um dos métodos utilizados é o cultivo das bactérias. Para que ocorra a reprodução das bactérias, se faz necessário um meio com condições favoráveis, por isso é realizado o cultivo de determinada amostra em uma placa que contém um meio de cultura com nutrientes necessários para o crescimento e isolamento. Após o cultivo a amostra irá passar por diversas provas, baseadas em ações bioquímicas, para determinação da bactéria em questão. Tais como, catalase, coagulase, DNase, Ágar Sal Manitol e Sensibilidade a Novobiocina, que são provas para identificação e diferenciação do gênero e espécie *Staphylococcus* spp. Em suma, métodos fenotípicos envolvem a observação das características físicas e bioquímicas dos patógenos, como a morfologia celular, a coloração de Gram, a capacidade de fermentar açúcares e a produção de enzimas específicas. Esses métodos são úteis para a identificação de patógenos comuns, mas podem não ser suficientes para distinguir entre diferentes cepas ou subtipos de patógenos.

Estudos recentes têm se dedicado a investigar a estrutura da comunidade bacteriana presente em carcaças e cadáveres. Esses estudos utilizaram técnicas de sequenciamento de alto rendimento para analisar a diversidade microbiana, sendo que a identificação de patógenos pode ser feita por meio de várias técnicas, incluindo métodos moleculares. Os métodos moleculares para identificação de patógenos geralmente envolvem a extração do material genético do patógeno, seguida pela amplificação e detecção de sequências específicas de DNA ou RNA. A amplificação é geralmente realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), que é uma técnica que permite a amplificação exponencial de uma sequência de DNA específica. A PCR requer a adição de iniciadores (ou primers) que se ligam a sequências específicas de DNA e iniciam a amplificação. Esses métodos são mais sensíveis e específicos do que os métodos fenotípicos e podem ser usados para identificar patógenos com base em sequências de genes específicos ou em perfis de sequência de todo o genoma. Alguns exemplos de técnicas moleculares comuns incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR), o sequenciamento de nova geração (NGS) e a hibridização de sondas de ácido nucleico. A escolha do método de identificação depende do tipo de patógeno, da disponibilidade de recursos e da finalidade da identificação. Em geral, os métodos moleculares são mais precisos e rápidos do que os métodos fenotípicos, mas também podem ser mais caros e exigir equipamentos especializados (Versalovic e Lupski, 2002).

Para identificação de fungos os métodos que Filho et al. 2008 utilizou foram três: exame direto com microscopia óptica, cultura da amostra clínica e o micro cultivo em lâminas de vidro para fungos filamentosos.

1. Exame direto com microscopia óptica: Pequenas alíquotas do material coletado foram processadas e colocadas em uma lâmina de vidro. Adicionou-se hidróxido de potássio para clarear a amostra, que foi então coberta com uma lamínula e examinada em um microscópio óptico. Foi observada a presença ou ausência de estruturas fúngicas, como hifas, pseudo-hifas ou blastoconídios.
2. Cultura do espécime clínico: Uma parte do material coletado foi semeada em placas de Petri contendo diferentes meios de ágar. Esses meios incluíam ágar Sabouraud com glicose, ágar Sabouraud com vancomicina e polimixina B para inibir a contaminação bacteriana e ágar Sabouraud com vancomicina, polimixina B e cicloheximida para inibir o crescimento bacteriano e de fungos oportunistas. As placas foram incubadas e as colônias de fungos foram observadas e identificadas.
3. Microcultivo em lâminas de vidro para fungos filamentosos: Essa técnica envolveu a preparação de placas de Petri com uma lâmina de vidro apoiada em um suporte estéril. A lâmina foi coberta com uma lamínula e toda a configuração foi mantida em condições estéreis. Esse método foi usado para avaliar as estruturas micromorfológicas dos fungos, como corpos de frutificação e ornamentação

#### **4.4.3 PRINCIPAIS POSSÍVEIS MICRORGANISMOS UTILIZADOS COMO BIOMARCADORES PARA O INTERVALO POST- MORTEM**

Ao utilizar métodos tradicionais, tais como cultivo bacteriano e fúngico, para identificação de bactérias, foi possível identificar diversas bactérias associadas à decomposição do corpo humano e algumas mudanças de componentes devido ao declínio de oxigênio. As espécies de *Staphylococcus* foram as primeiras a migrarem do intestino delgado sendo seguidas por coliformes e fungos, depois coliformes anaeróbios. Houve uma mudança de bactérias aeróbias para anaeróbicas nos estágios iniciais à medida que a decomposição progredia (Vass, 2001). Foi observado que *Staphylococcus* e *Neisseria* spp. predominavam no início do PMI, porém foram substituídos por *Flavobacterium* spp. e *Lactobacillus* no PMI tardio. O Projeto Microbioma Humano descobriu que as comunidades microbianas do corpo humano variam em composição em diferentes partes do corpo. Em estudos de decomposição, foi observado que as comunidades bacterianas nas amostras de mucosa bucal são

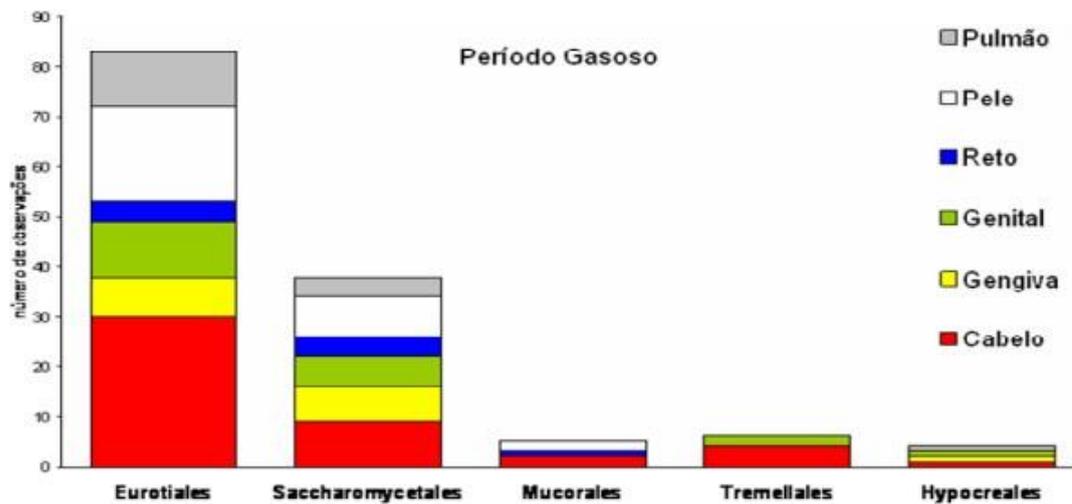
dominadas pelos filos Proteobacteria e Firmicutes, enquanto as amostras de fezes são dominadas pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes. À medida que a decomposição ocorre, as comunidades bacterianas apresentam variações temporais e se tornam mais semelhantes entre si. No entanto, estudos utilizando técnicas de sequenciamento de próxima geração (NGS) mostraram uma alta variabilidade nas comunidades bacterianas em diferentes níveis taxonômicos, como filo, família e gênero. Além disso, foi observado que a abundância relativa dos filos Proteobacteria e Firmicutes variam ao longo da decomposição e que a riqueza de táxons bacterianos diminui à medida que a decomposição avança, possivelmente devido à colonização por insetos e ao consumo subsequente da carcaça (Vass, 2001).

Foram observadas mudanças nas comunidades bacterianas da pele e da bocadurante a decomposição, tanto em experimentos com porcos como substitutos de cadáveres humanos, quanto em um modelo com camundongos. Os dados obtidos nesses estudos permitiram a criação de modelos para estimar o intervalo *postmortem* com base em padrões de sequência microbiana. Outra pesquisa investigou o microbioma interno de cadáveres colocados ao ar livre e identificou espécies bacterianas associadas ao estágio de inchaço da decomposição humana. No entanto, ainda há muito a ser descoberto sobre as fontes potenciais de bactérias colonizadoras e como essas comunidades microbianas mudam ao longo do tempo. A compreensão desses padrões de sucessão da comunidade pode fornecer ferramentas adicionais para pesquisadores forenses. Kumari e Yadav utilizaram abordagens baseadas em sequenciamento de ampliação de gene 16S rRNA, sendo que a extração do material utilizado foi por meio do clorofórmio após a dissecação dos tecidos e com o auxílio de um swab, foi coletado material dos tecidos dos órgãos e do sangue. O estudo apresenta algumas informações sobre as bactérias encontradas em diferentes partes do corpo durante a decomposição. Por exemplo, durante a decomposição de um cadáver, houve uma mudança significativa de bactérias aeróbicas para anaeróbicas em todos os tecidos. Além disso, em amostras de sangue, fígado, veia porta, nódulo linfático mesentérico e fluido pericárdico, foram detectados 21 gêneros de bactérias, sendo as cinco espécies mais abundantes: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia* spp. No entanto, é importante notar que essas informações não estão diretamente relacionadas aos estágios da decomposição mencionado no estudo.

Em um estudo realizado no Brasil, na cidade de Fortaleza – Ceará, foram investigadas características microbiológicas dos fungos presentes na flora *postmortem* e no processo de decomposição do corpo humano. Para obtenção do resultado da identificação dos fungos, foram usados três métodos: exame direto com microscopia óptica, cultura da amostra clínica e o micro cultivo em lâminas de vidro para fungos filamentosos.

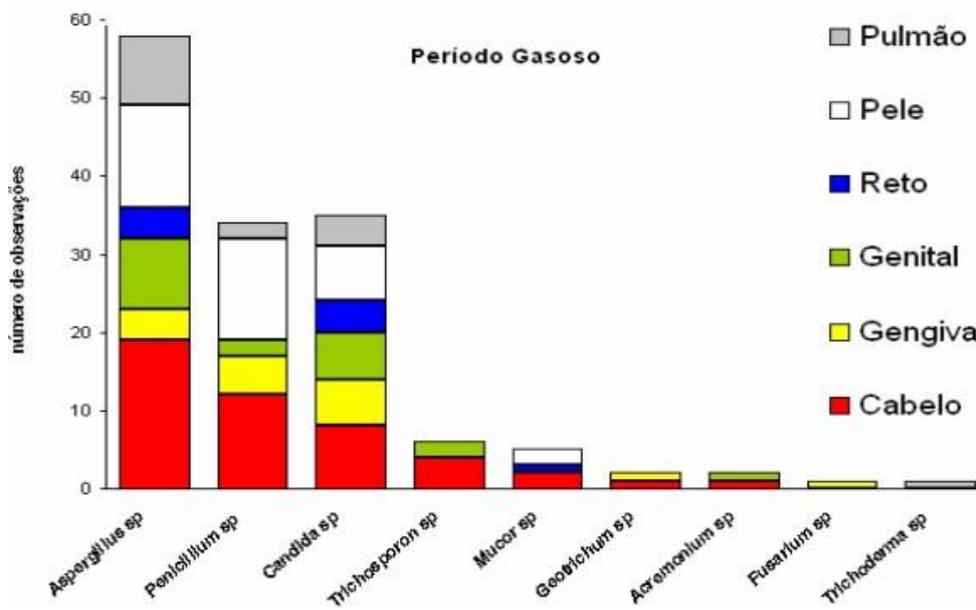
Dentro do período gasoso os fungos filamentosos mais presentes são: *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Mucor* spp, *Acremonium* spp, *Trichoderma* spp, *Fusarium* spp. E as leveduras: *Candida* spp, *Trichosporon* spp (Gráficos 1 e 2)

**Gráfico 1:** Sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas no período gasoso



Fonte: Filho et al., 2008

**Gráfico 2 –** Sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados no período gasoso



**Fonte:** Filho et al., 2008

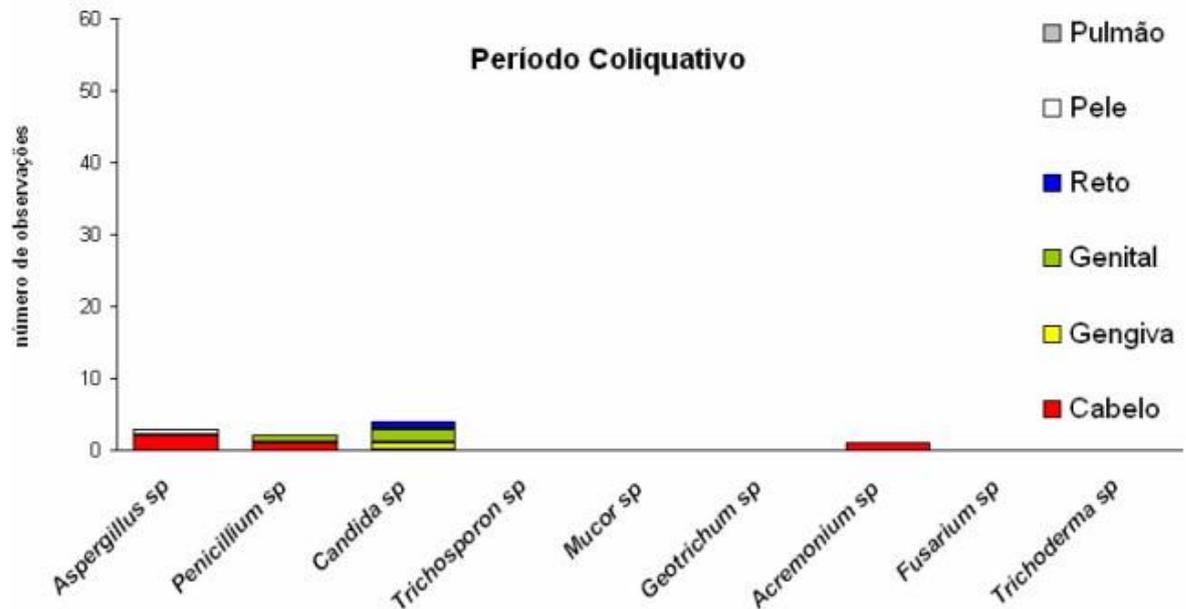
No período coliquativo foram encontrados, em maior quantidade, os fungos filamentosos: *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Acremonium* spp. E a levedura *Candida* spp (Gráficos 3 e 4).

**Gráfico 3** – Sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas no período coliquativo



**Fonte:** Filho et al., 2008

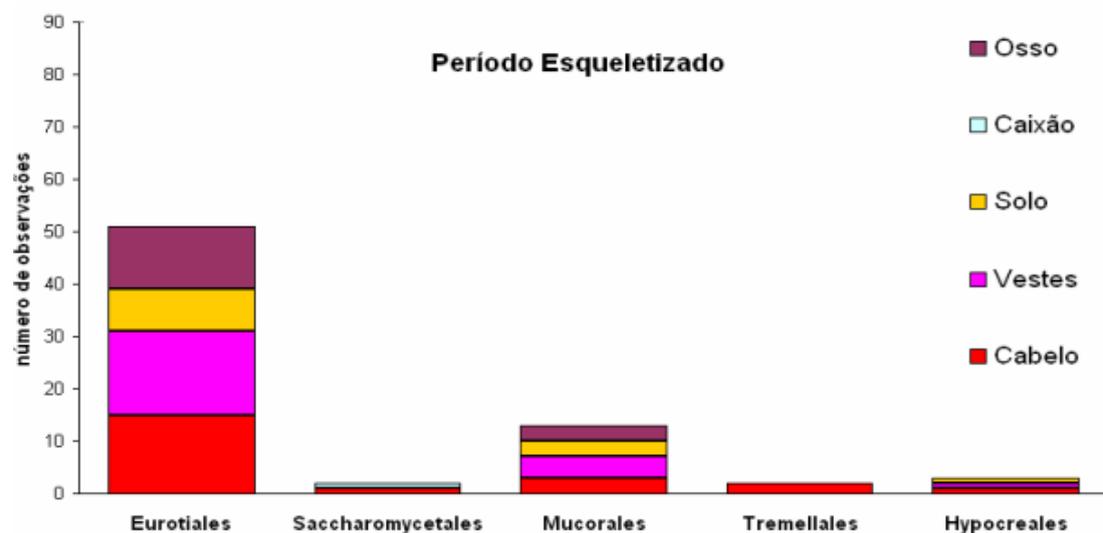
**Gráfico 4** – Sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados no período coliquativo



Fonte: Filho et al., 2008

Na fase da esqueletização foram encontrados apenas os fungos filamentosos: *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Mucor spp* (Gráficos 5 e 6).

**Gráfico 5** – Sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas no período da esqueletização



Fonte: Filho et al., 2008

**Gráfico 6** – Sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados no período da esqueletização



Fonte: Filho et al., 2008

## 5 DISCUSSÃO

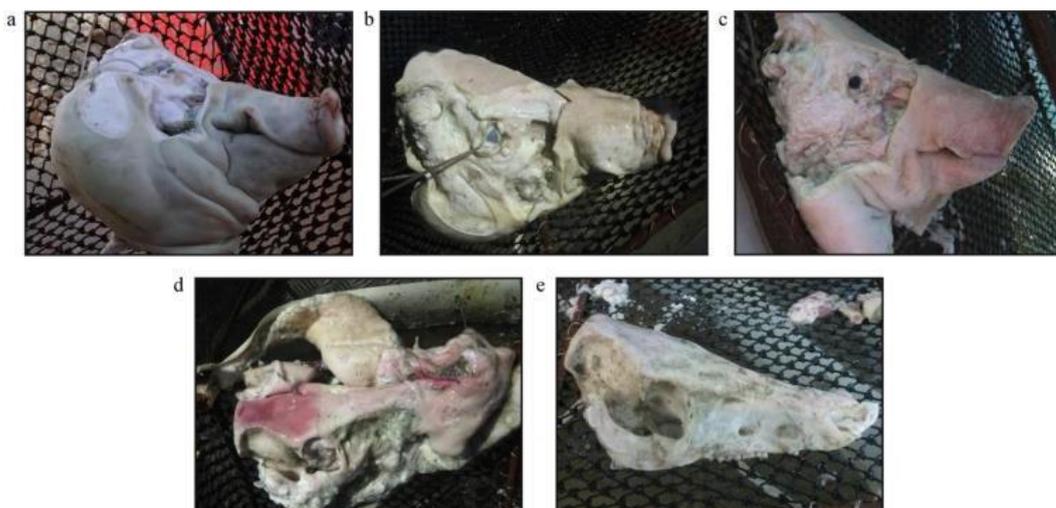
A microbiologia dentro da medicina forense para determinação de IPM ainda é discutida e dada como controversa, pois por se tratar de uma análise microbiológica é muito rápido e fácil a contaminação da amostra que será levada para análise, principalmente quando se trata de uma cultura para identificação dos microrganismos presentes, gerando resultados falsos-positivos. Os resultados falsos-positivos podem ser reduzidos quando algumas precauções são tomadas, como manter o corpo em ambiente frio após a morte, realizar a autópsia dentro de 48 horas após a morte e coletar as amostras antes da manipulação do trato gastrointestinal. Entretanto não é em todos os casos que essas precauções podem ser tomadas (Yıldırım, Mahmut, et al, 2015).

Foi realizado um estudo cujo objetivo era investigar a sucessão bacteriana marinha como um indicador do intervalo de submersão *postmortem* (PMSI) em restos humanos e animais em ambientes aquáticos. A metodologia utilizada para identificação das bactérias foi a análise de sequências do gene 16S rRNA, onde as amostras foram coletadas a partir de restos parciais de porcos submersos em um ambiente marinho durante o outono e o inverno, e a colonização bacteriana foi documentada ao longo

do tempo. As sequências do gene 16S rRNA foram amplificadas por PCR e clonadas para análise. As sequências de clones foram então comparadas com sequências de referências no banco de dados GenBank para identificar as bactérias presentes nas amostras.

O estudo constatou que as bactérias marinhas colonizaram rapidamente os restos submersos de forma sucessiva, e que foram observadas diferenças sazonais na taxa de decomposição e em vários grupos de bactérias colonizadoras. As bactérias identificadas pertenciam ao filo Proteobacteria, principalmente  $\gamma$ -Proteobacteria, mas também membros dos filos Bacteroidetes (divisão Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB)), Firmicutes, Fusobacteria e Actinobactéria. No total, foram identificadas 15 ordens, 21 famílias e 39 gêneros de bactérias. A análise da sucessão bacteriana marinha pode ser uma ferramenta útil para estimar o intervalo de submersão pós-morte (PMSI) em restos humanos e animais em ambientes aquáticos. A composição da comunidade bacteriana mudou com o tempo, com diferentes espécies de bactérias predominando em diferentes estágios de decomposição (Figura 9). Com base nesses resultados, os pesquisadores sugerem que a análise da sucessão bacteriana marinha pode ser uma ferramenta valiosa para complementar outras técnicas forenses na estimativa do PMSI em casos de morte em ambientes aquáticos (Dickson et al. 2011).

**Figura 9** - Cadáver de porco em cada estado de decomposição



**Fonte:** Dickson et al., 2011

Outro estudo foi realizado buscou entender como as comunidades bacterianas mudam ao longo do tempo em cadáver submersos e como essas mudanças podem ser usadas para estimar o PMSI, onde foi utilizada a mesma metodologia pelo estudo anteriormente descrito, para identificação das bactérias. O estudo forneceu uma compreensão mais profunda das sucessões bacterianas em cadáveres submersos e como essas mudanças podem ser utilizadas para estimar o PMSI. Os resultados mostraram que as comunidades bacterianas mudam de maneira previsível ao longo do tempo em cadáveres submersos, e que essas mudanças podem ser usadas para estimar o PMSI com uma precisão razoável. Ademias o estudo mostrou que o sequenciamento do gene 16S rRNA é uma ferramenta poderosa para estudar as comunidades bacterianas em cadáveres submersos. Se faz necessário mais pesquisas para validação dos resultados e melhorar a precisão das estimativas (Dmitrijs et al. 2022).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiologia aplicada à medicina forense na estimativa do intervalo *postmortem* é um método já utilizado, mesmo que seja considerada como controversia. Entretanto, possui suas limitações e ônus como o tempo de espera que é necessário para que tenha o crescimento e isolamento das colônias para realização da identificação e diferenciação de gênero e espécie. Portanto são metodologias inigualáveis para confirmação e determinação mais exata do IPM, mas não são ferramentas essenciais.

Quando aplicada à casos especiais, como em casos em que há submersão de cadáveres, a microbiologia está se apresentando como técnica fundamental para estimativa do PMSI. Nestes casos, temos alteração direta do ambiente em relação a decomposição do corpo humano, onde a sucessão bacteriana continuou mudando de acordo com os estágios de decomposição. Ainda que incontestável o uso de técnicas forenses diversas à micrológica para complementar a mesma, é uma ferramenta valiosa para PMSI.

É de extrema importância que esse tema seja abordado com mais frequência para que estabeleça a real proeminência do papel da microbiologia dentro da medicina forense como uma ferramenta rotineira para estimativa do intervalo *postmortem*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLINTOCK, J Thomas Mc; ERQUIAGA, Michael J; FABBRI, Mia R. Changes in the Microbiome at the Onset and End of Decomposition. **Journal of Biotechnology & Bioinformatics Research**, p. 1–5, 2020.
- CRISTINE SOUZA GOEBEL; DE, Flávio; LUIZ CARLOS SEVERO; *et al.* Análise micológica durante a decomposição cadavérica. v. 12, n. 1, p. 28–28, 2013.
- DICKSON, Gemma C.; POULTER, Russell T.M.; MAAS, Elizabeth W.; *et al.* Marinebacterial succession as a potential indicator of postmortem submersion interval. **Forensic Science International**, v. 209, n. 1-3, p. 1–10, 2011.
- DMITRIJS, Finkelbergs; GUO, Juanjuan; HUANG, Yecao; *et al.* Bacterial Succession in Microbial Biofilm as a Potential Indicator for Postmortem Submersion Interval Estimation. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.
- DROR, Itiel; MELINEK, Judy; ARDEN, Jonathan L.; *et al.* Cognitive bias in forensic pathology decisions. **Journal of Forensic Sciences**, v. 66, n. 5, 2021.
- FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, Amparo; ALBEROLA, Juan; COHEN, Marta Cecilia. Análisis microbiológico post mórtem. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 10, p. 685–691, 2013.
- FILHO, Moreira; EVANDO, Renato. Micologia forense: a dinâmica da microbiota fúngica na investigação do período post mortem. **repositorio.ufc.br**, 2008.
- FRANCESCHETTI, Lorenzo; AMADASI, Alberto; BUGELLI, Valentina; *et al.* Estimation of Late Postmortem Interval: Where Do We Stand? A Literature Review. **Biology**, v. 12, n. 6, p. 783–783, 2023.
- GARCIA-RUIZ, Eva; AUXILLOS, Jamie; LI, Tianyi; *et al.* **Chapter Ten - YeastFab: High-Throughput Genetic Parts Construction, Measurement, and Pathway Engineering in Yeast.** ScienceDirect.
- GONCALVES, Nilo Jorge Rodrigues. **LIVOR MORTIS NA PRÁTICA MÉDICO-LEGAL.** Perspectivas em Medicina Legal e Perícia Médica.
- HAUTHER, Kathleen A.; COBAUGH, Kelly L.; JANTZ, Lee Meadows; *et al.* Estimating Time Since Death from Postmortem Human Gut Microbial Communities. **Journal of Forensic Sciences**, v. 60, n. 5, p. 1234–1240, 2015.
- HYDE, Embriette R.; HAARMANN, Daniel P.; PETROSINO, Joseph F.; *et al.* Initial insights into bacterial succession during human decomposition. **International Journal of Legal Medicine**, v. 129, n. 3, p. 661–671, 2014.
- ISHII, Kiyoshi; HITOSUGI, Masahito; KIDO, Masahito; *et al.* Analysis of fungi detected in human cadavers. **Legal Medicine**, v. 8, n. 3, p. 188–190, 2006.
- JAVAN, Gulnaz T.; FINLEY, Sheree J.; ABIDIN, Zain; *et al.* The Thanatomicrobiome: A Missing Piece of the Microbial Puzzle of Death. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- KOVÁCS, Maria Julia. Desenvolvimento da Tanatologia: estudos sobre a morte e o morrer. **Paidéia (Ribeirão Preto)**, v. 18, n. 41, p. 457–468, 2008.
- KUMARI, Pallavi; YADAV, Shubham. Investigating the Post-Mortem Interval (PMI) with Forensically Important Necrobiomes. **Indian Journal of Forensic Medicine &**

**Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 97–103, 2023.

PORTO, Aimée Christine Alcântara Ribeiro Szönyi; MIZIARA, Ivan Dieb. Dificuldades diagnósticas da causa mortis em cadáveres decompostos. **Saúde Ética & Justiça**, v. 24, n. 2, p. 57–66, 2019.

ROBINSON, Jake M.; PASTERNAK, Zohar; MASON, Christopher E.; *et al.* Forensic Applications of Microbiomics: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2021.

SCHATZMAYR, Hermann G.; BARTH, Ortrud Monika. Bioterrorismo e microrganismos patogênicos Apresentação. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 20, p. 1735–1749, 2013.

TAMBUZZI, Stefano; MACIOCCO, Francesca; GENTILE, Guendalina; *et al.* Applications of microbiology to different forensic scenarios - A narrative review. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 98, p. 102560, 2023.

UENO, Akio; SHIMIZU, Satoru; TAMAMURA, Shuji; *et al.* Anaerobic decomposition of humic substances by Clostridium from the deep subsurface. **Scientific Reports**, v. 6, p. 18990, 2016. Acesso em: 3 nov. 2023.

VERSALOVIC, James; LUPSKI, James R. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 10, p. s15–s21, 2002.

YILDIRIM, Mahmut; SINAN, Sevinç; AKÇAN, Ramazan; *et al.* Mikrobiyolojik Yöntemlerin Postmortem İnterval Tahmininde Kullanımı. **The Bulletin of Legal Medicine**, v. 20, n. 1, 2015.

ZONTA, Bernardo Martins; FERREIRA, Danton Capistrano; SBORZ, Gustavo; *et al.* TANATOLOGIA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **REVISTA FOCO**, v. 15, n. 2, p. e379–e379, 2022.