

Análise micológica durante a decomposição cadavérica

Mycological analysis during the cadaveric decomposition

Cristine Souza Goebel¹, Flávio de Mattos Oliveira², Luiz Carlos Severo³, Juliane Bentes Picanço⁴, Clarice Sampaio Alho⁵

¹Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Professora Assistente da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS- Brasil.

²Doutor em Ciências Pneumológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Micologia, Santa Casa-Complexo Hospitalar de Porto Alegre, RS-Brasil.

³Doutor em Medicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pesquisador 1B do CNPq, Professor Associado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita, Santa Casa-Complexo Hospitalar de Porto Alegre, RS-Brasil.

³Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Biociências, Laboratório de Genética Humana e Molecular. Porto Alegre, RS-Brasil.

⁴Doutora em Fisiopatologia e Patologia Molecular pela Universitat de Barcelona, UB, Espanha, Pesquisadora e Professora da Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS-Brasil.

Resumo

Introdução: Assim como na entomologia forense, onde os insetos fornecem informações para a medicina legal, os fungos, que também aparecem na superfície dos corpos de humanos e animais em decomposição, podem ser uma ferramenta útil para a Tanatologia. Devido às variações climáticas, geográficas e ecológicas das diferentes regiões do mundo, as informações acerca do padrão fúngico terão diferentes contribuições na micologia forense. **Objetivo:** Analisar o crescimento dos fungos em cadáveres de suínos em decomposição na região metropolitana da capital do Rio Grande do Sul, Brasil, durante o verão. **Métodos:** Foram utilizados dois suínos expostos em ambiente aberto no município de Viamão, durante o verão (mês de dezembro). As colheitas de amostras fúngicas foram realizadas com um intervalo de 5, 10, 15, 20 e 30 (dias após a exposição). **Resultados e Conclusão:** Em 30 dias de exposição os fungos isolados foram predominantemente *Candida spp* e *Penicillium spp*. Este é o primeiro trabalho que trata do tema no Brasil.

Palavras-Chave: Medicina legal. Micologia. Tanatologia

Abstract

Introduction: As well as in forensic entomology, where the insects provide information to legal medicine, fungi, which also appear on the surface of human bodies and decaying animals, can be a useful tool for Thanatology. Due to climatic, geographical and ecological different regions of the world, information about the different contributions in pattern will have fungal Mycology forensics. **Objective:** Analyze the growth of fungi in rotting pig corpses in the metropolitan region of Rio Grande do Sul, Brazil, during the summer. **Methodology:** Two pigs were exposed in an open environment in the municipality of Viamão during the summer (December). Fungal samples were collected with an interval of 5, 10, 15, 20 and 30 (days after treatment). **Results and Conclusion:** In 30 days of exposure fungi *Candida spp.* isolates were predominantly and *Penicillium spp.* This is the first work that deals with the theme in Brazil.

Keywords: Forensic Medicine. Mycology. Thanatology

INTRODUÇÃO

A entomologia forense é uma ferramenta útil nas investigações criminais¹ não só para determinar o intervalo de tempo de morte ou verificar uso de drogas², como também para identificar o uso de venenos³, a estação do ano que ocorreu a morte, a localização geográfica, os sítios específicos do trauma no corpo do cadáver, ou a identificação de artefatos não só no corpo, mas também na cena do

crime⁴. E devido às diferenças climáticas,³ geográficas e características ecológicas⁵ peculiares de cada região, dados de entomologia forense têm sido descritos em diversas localidades como Estados Unidos da América, Canadá, Itália, Alemanha, Espanha, Colômbia, Índia, Malásia e Tailândia².

Assim como os insetos e artrópodes, os fungos também aparecem na superfície de humanos e animais e, desta forma, a micologia também pode ser utilizada como uma ferramenta para auxiliar na elucidação dos itens citados acima⁶.

Espécies fúngicas apresentam distribuição restrita e específica, exigências ecológicas, produção de esporos sazonal e outros fatores úteis para a Tanatologia⁷.

Correspondência / Correspondence: Clarice Sampaio Alho. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C, sala 233. 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: csalho@pucrs.br

Estudos de micologia forense relatam, por exemplo, a identificação de fungos na dentina humana após 50 anos decorridos da morte do cadáver⁸, e a identificação de espécies fúngicas em um corpo mumificado ou em restos de esqueleto humano. O fungo predominantemente encontrado é o *Erotium repens*⁹. Como colonizador da superfície da pele e ossos⁹ em outro estudo, a identificação das espécies fúngicas, *Penicillium sp.* e *Aspergillus terreus* em um homem de 71 anos encontrado no fundo de um poço de seis metros, onde a parte inferior de seu corpo estava submerso na água¹⁰, foi a prova essencial no processo penal¹⁰.

Com a finalidade de se ampliar o conhecimento da micologia forense nas investigações criminais¹¹, desenvolvemos este trabalho analisando o crescimento fúngico em cadáveres suínos na tentativa de incrementar esta ferramenta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Suínos: O *Sus scrofa domesticus* tem pele com pelagem espaçada que recobre uma espessa camada de tecido adiposo. Entre os mamíferos em que os órgãos e o corpo apresentam compatibilidade morfológica com o homem, o suíno é considerado como o mais próximo, sendo bem aceita e regulada sua utilização na investigação. Esse animal apresenta semelhanças anatômicas e fisiológicas com humanos, e seus hábitos alimentares e a fisiologia digestiva são também similares. Os animais aqui utilizados não foram abatidos pelos propósitos do experimento e sim para os fins comerciais da fazenda de produção/abate^{12,13}, juntamente com os demais animais do lote destinado à comercialização no frigorífico/açougue. Os animais foram adquiridos da fazenda de produção/abate, antes da sua comercialização em frigorífico/açougue. Essa medida garantiu a precisão sobre os dados da morte do animal, cuja exatidão permite a qualidade do experimento.

Foram utilizados dois suínos de 6 Kg expostos em ambiente aberto no município de Viamão na região

metropolitana da capital do Rio Grande do Sul, Brasil, durante o verão (mês de dezembro). Os suínos foram acondicionados em gaiolas para evitar ação predadora.

Simulação do encontro dos cadáveres: Uma gaiola foi exposta ao sol e a outra na mata fechada protegida da exposição solar. Cada gaiola foi monitorada com um termômetro analítico, para controlar as temperaturas máximas e mínimas, e também com um higrômetro, para controlar a umidade do local. Com o intuito de simular casos reais de homicídios de vítimas com idade inferior a 10 anos de idade, já ocorridos no Brasil, o animal exposto ao sol foi acondicionado dentro de um saco plástico.

Colheitas: Após a exposição dos dois suínos (tempo 0), as colheitas de amostras fúngicas foram realizadas com um intervalo de 5, 10, 15, 20 e 30 dias após a exposição. As colheitas ocorreram sempre no turno da manhã, no horário entre 9h 25 min e 10h 45 min.

Colheita para análise do crescimento fúngico: Para o exame direto foi realizado esfregaço com um swab estéril de cada região do suíno, o qual foi posteriormente corado pela técnica prata metenamina (Gomori-Grococh). Para o exame de cultivo fúngico as amostras foram colhidas com swab estéril da superfície de três regiões do corpo de ambos os suínos. Foram utilizados ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Mycosel (ágar Sabouraud com cloranfenicol e ciclohexamida) para inibir o crescimento bacteriano, incubados a 25°C e observados diariamente para análise do crescimento fúngico por até 30 dias após a colheita do material. Os cultivos que apresentaram crescimento fúngico foram analisados macro e microscopicamente.

RESULTADOS

Os dados de temperatura e umidade estão apostos na Tabela 1. O estado de decomposição do suíno exposto ao sol e do suíno exposto na sombra (mata fechada) estão ilustrados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1- Temperatura e umidade relativa do ar no local do suíno exposto ao sol (A) e exposto à sombra (B)

DIAS HORÁRIO	0 09h50min	5 09h50min	10 9h30min	15 10h30min	20 9h25min	30 10h44min
(A)						
TEMPERATURA NA HORA (°C)	25,2	23,2	24,5	27,4	24,5	28,0
TEMPERATURA MÁXIMA (°C)	33,1	34,8	34,8	31,9	34,5	32,0
TEMPERATURA MÍNIMA (°C)	11,3	15,7	10,0	10,9	12,0	14,0
UMIDADE RELATIVA NA HORA (%)	66	61	55	53	58	53
UMIDADE RELATIVA MÁXIMA (%)	99	99	99	99	99	99
UMIDADE RELATIVA MÍNIMA (%)	40	40	45	45	45	44
(B)						
TEMPERATURA NA HORA (%)	23,2	22,2	21,7	24,0	22,0	25,0
TEMPERATURA MÁXIMA (%)	24,4	25,0	21,0	23,4	26,0	29,0
TEMPERATURA MÍNIMA (%)	16,3	15,7	20,0	19,0	8,0	12,0
UMIDADE RELATIVA NA HORA (%)	67	61	52	45	53	48
UMIDADE RELATIVA MÁXIMA (%)	99	99	99	99	99	99
UMIDADE RELATIVA MÍNIMA (%)	40	40	45	45	45	44

A análise do exame direto está demonstrada na Tabela 2. Os resultados do exame direto foram negativos até o dia 15. A partir do dia 20 de exposição, o exame direto apresentou-se positivo para as amostras da nádega (Figura 3-A) e da cabeça do suíno exposto ao sol, e para todas as amostras a partir do dia 30 de exposição (Figura 3-B), com exceção apenas da amostra da nádega do suíno exposto à sombra.

As análises do crescimento fúngico das cinco

colheitas estão na Tabela 3 e na Figura 3-C. Os fungos predominantemente isolados foram *Candida spp.* e *Penicillium spp.* Também foram visualizados blastos arthroconídios sugestivo de *Trichosporon sp.* (Figura 3-D), nas amostras do dia 5 de exposição da nádega e do dia 20 de exposição do lombo do suíno exposto na sombra. *Aspergillus flavus* foi isolado nas amostras do dia 15 de exposição da cabeça do suíno exposto na sombra.

Tabela 2- Exame direto com coloração de prata: Análise do crescimento fúngico de amostras provenientes do suíno exposto ao sol (A) e do exposto à sombra (B).

DIA	5	10	15	20	30
(A)					
LOMBO	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Candida</i> sp.
NÁDEGAS	(-)	(-)	(-)	<i>Candida</i> sp.	<i>Candida</i> sp.
CABEÇA	(-)	(-)	(-)	<i>Candida</i> sp. macroconídio	<i>Candida</i> sp.
(B)					
LOMBO	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Candida</i> sp.
NÁDEGAS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CABEÇA	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Candida</i> sp.

(-) negativo.

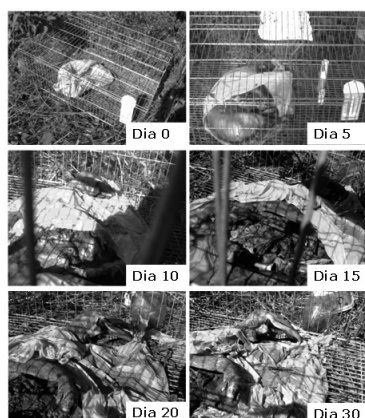


Figura 1 – Suíno exposto ao sol (acondicionado no interior de um saco plástico) em cada dia de coleta exposto ao sol (A) e do exposto à sombra (B)

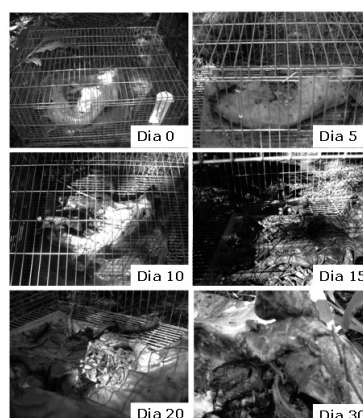


Figura 2 – Suíno exposto à sombra (interior da mata fechada) em cada dia de coleta

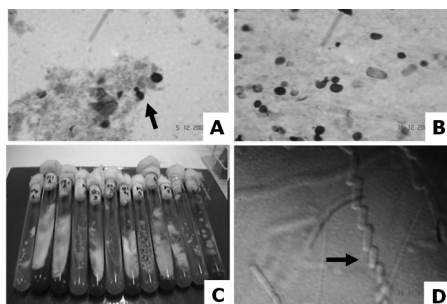


Figura 3 – A- Exame direto. Análise do esfregaço das amostras do dia 20 de exposição da nádega do suíno exposto ao sol. Coloração prata. Visualização de blastoconídios com brotamento sugestivo de *Candida* spp. B- Exame direto. Análise do esfregaço das amostras do dia 30 de exposição do lombo do suíno exposto à sombra. Coloração prata. Visualização de blastoconídios sugestivo de *Candida* spp. Representativo dos demais exames direto a partir do dia 30 de exposição, com exceção apenas da amostra da nádega do suíno exposto à sombra. C- Padrão do crescimento fúngico nos meios de cultivo ágar Sabouraud com cloranfenicol e Mycosel; D- Microscopia do cultivo das amostras do dia 5 de exposição da nádega e do dia 20 de exposição do lombo do suíno exposto na sombra. Arthroconídios sugestivo de *Trichosporon* sp.

Tabela 3 - Exame do cultivo: Análise do crescimento fúngico em meio de cultivo de amostras provenientes do suíno exposto ao sol (A) e do exposto à sombra (B)

DIA	5	10	15	20	30
(A)					
LOMBO	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
NÁDEGAS	Bactérias <i>Candida albicans</i>	Bactérias <i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
CABEÇA	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
(B)					
LOMBO	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	Arthroconídios em escada	<i>Candida sp.</i>
NÁDEGAS	Arthroconídios em escada <i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>
CABEÇA	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i> <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida sp.</i>

DISCUSSÃO

Nossos resultados não demonstraram uma diferença significativa do padrão de crescimento do suíno exposto ao sol e à sombra. Observou-se o predomínio de crescimento de *Candida spp.*, o qual é um fungo colonizador natural da pele e das mucosas¹⁴. Contudo, a detecção direta deste fungo não se deu nos primeiros dias, o que pode ser explicado por não haver quantidade suficiente para positivar o teste. Também foram evidenciados *Penicillium spp.* e *Aspergillus flavus*, sendo estes dois fungos ubíquos e frequentemente encontrados como saprófitos¹⁵, já descritos como presentes em outros animais¹⁶. Dois estudos prévios com fungos em cadáveres relataram *Erotium repens*¹, *Penicillium sp.* e *Aspergillus terreus*¹⁰ como as espécies predominantemente encontradas em cadáveres humanos, provavelmente pelo fato destes fungos serem, respectivamente, também colonizadores naturais da pele e ossos, ou encontrados no ambiente. Em duas amostras do suíno exposto à sombra (nádega-dia 5 e lombo-dia 20) foram visualizados blastos arthroconídios sugestivo de *Trichosporon sp.* O gênero *Trichosporon* é composto de 17 espécies¹⁷. Este gênero apresenta na microscopia da colônia arthroconídios e blastoconídios, sendo que a confirmação e a diferenciação das espécies são realizadas com base no padrão de assimilação de carboidratos e outras propriedades bioquímicas¹⁷. É um fungo ubíquo, podendo ser encontrado, por exemplo, na água, no solo, nas plantas, como também pode fazer parte da microbiota de humanos e de alguns animais¹⁸.

A negatividade do exame de cultivo do dia 0 a 15 é um resultado que pode ser útil na Tanatologia. Ainda mais relevante, foi a positividade no exame direto a partir do dia 20 para duas amostras, e a partir do dia 30 para cinco das seis amostras. Este período de 20 a 30 dias foi o necessário para que os fungos se reproduzissem e atingissem um número adequado a sua identificação no exame direto. Esse dado pode ser complementar na estimativa do intervalo de tempo de morte em investigações criminais. No entanto, corroborando com

Menezes et al.¹¹ sabe-se da necessidade de estudos complementares. Como citam Ishii et al.¹⁹, pode-se ter a expectativa de tornar a micologia forense uma ferramenta útil e confiável nas investigações criminais.

Na região metropolitana da capital do Rio Grande do Sul, Brasil existe uma média de três mortes diárias decorrentes de homicídio e/ou suicídio (Dados do Departamento de Criminalística do Instituto Geral de Perícias do RS). A ampla maioria deles tem identificação facilitada através dos meios clássicos. Contudo, eventualmente, a micologia forense poderá ser necessária, como foi o caso publicado por Hitosugi, et al. 2006¹⁰ para elucidar tais itens.

Em 30 dias de exposição os fungos isolados foram predominantemente *Candida spp* e *Penicillium spp*. Esse trabalho é um esforço no sentido de contribuir neste campo do saber que, para o qual até o presente momento não havia dados para o Brasil.

REFERÊNCIAS

- ISHII, K. et al. Analysis of fungi detected in human cadavers. **Leg. Med.**, Tokyo, v.8, n. 3, p. 188-190, 2006.
- SUKONTASON, K. et al. Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. **Parasitol. Res.**, Berlin, v. 101, n. 5, p. 1417-1423, 2007.
- VAIN, S. et al. Use of Lucilla species for forensic investigations in Southern Europe. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v. 177, n. 1, p. 37-41, 2008.
- CAMPOBASSO, C.; INTRONA, F. The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v. 120, n.1-2, p. 132-139, 2001.
- WANG, J. et al. The succession and development of insects on pig carcasses and their significances in estimating PMI in south China. **Forensic Sci. Int.**, Lausanne, v. 179, n. 1, p. 11-18, 2008.
- CARTER, D.; TIBBETT, M. Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. **J. Forensic Sci. Soc.**, London, v. 49, n. 1, p. 168-171, 2003.
- GUNN, A. Protists, fungi and plants in forensic science. In: **Essencial Forensic Biology**. Hoboken : John Wiley & Sons, 2006. p. 141-142.
- OLIVEIRA, R. et al. Fungal infiltration in the human dentine: archae-

- ology and forensic implications. **Ciênc. Odontol. Bras.**, São José dos Campos, v. 7, n. 3, p. 87-90, 2004.
9. ISHII, K. et al. Analysis of fungi detected in human cadavers. **Leg. Med.**, Tokyo, v. 8, n. 3, p. 188-190, 2006.
10. HITOSUGI, M. et al. Fungi can be a useful forensic tool. **Leg. Med.**, Tokyo, v. 8, n. 4, p. 240-242, 2006.
11. MENEZES, R.; KANCHAN, T.; LOBO, S. Cadaveric fungi: Not yet an established forensic tool. **J. Forensic Leg. Med.**, Kidlington, v. 15, n. 2, p. 124-126, 2008.
12. VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F.; SILVA, L. C. Abate de Suínos. **Boletim Técnico**, Vitória, 31 jul. 2007. PIE-UFES:01407. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatoriosassociados/ABIPECS_relatorio_2007_pt.pdf> Acesso em: 20 mar. 2012.
13. PACHECO, J. W.; YAMANAKA, H. T. **Guia técnico ambiental abate** (bovino e suíno). São Paulo: CETESB, 2006. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/producao_limpa/documentos/frigorifico.pdf>.
14. HAVLICKOVA, B.; CZAIKA, V.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, Berlin, v.51, suppl. 4, p. 2-15, 2008.
15. PITTI, J. The current role of Aspergillus and Penicillium in human and animal health. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, v. 32, suppl. 1, p. 17-32, 1994.
16. KUTTIN, E.; MÜLLER, J. The fungal flora of zoo animals' ears. **Mycoses**, Berlin, v. 32, n. 1-2, p. 59-60, 1994.
17. GIRMENIA, C. et al. Invasive infections caused by Trichosporon species and Geotrichum capitatum in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1818-1828, 2005.
18. POTTIER, I. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: Geotrichum candidum. **Int J Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 327-332, 2008.
19. ISHII, K. et al. The importance of forensic mycology. **Leg. Med.**, Salem, v. 9, n. 5, p. 287, 2007.

Submetido em 29.09.2012;

Aceito em 04.04.2013.