



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

RENATO EVANDO MOREIRA FILHO

**MICOLOGIA FORENSE: A DINÂMICA DA MICROBIOTA FÚNGICA NA
INVESTIGAÇÃO DO PERÍODO *POST MORTEM***

Fortaleza - Ceará

2008

RENATO EVANDO MOREIRA FILHO

**MICOLOGIA FORENSE: A DINÂMICA DA MICROBIOTA FÚNGICA NA
INVESTIGAÇÃO DO PERÍODO *POST MORTEM***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal do Ceará.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Fortaleza-Ceará

2008

RENATO EVANDO MOREIRA FILHO

**MICOLOGIA FORENSE: A DINÂMICA DA MICROBIOTA FÚNGICA NA
INVESTIGAÇÃO DO PERÍODO *POST MORTEM***

Dissertação submetida à apreciação da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da mencionada instituição. A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida desde que seja feita em consonância com as normas da ética científica.

Defesa formal aprovada em 29/ 08 / 2008 pela banca examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante - Orientadora
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra de Araujo
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Faculdade de Veterinária
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Helvécio Neves Feitosa
Faculdade de Medicina
Universidade de Fortaleza

À Tania Vicente Viana e Sávio Moreira Viana -
cuja doce companhia gera meus momentos de
poesia – dedico.

AGRADECIMENTOS

Uma obra dessa natureza, certamente, não é resultado do esforço de um só. Expresso meu reconhecimento e agradecimento aos que contribuíram direta ou indiretamente para que o esforço despendido se concretizasse neste trabalho. O que ele possui de relevante, divido os méritos com os infra citados, os eventuais equívocos, assumo-os sozinho.

À prof^a. Dr^a. Tania Vicente Viana, esposa, cúmplice e companheira de primeira hora, pelo profissionalismo e estímulo contínuos em todos os momentos da realização desse Mestrado, sendo, ela mesma, exemplo de educadora e de formadora científica;

À Universidade Federal do Ceará (UFC) através do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pela estrutura física e de material de laboratório que possibilitaram a execução da pesquisa no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM);

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – Mestrado, pelo compartilhamento de experiências e opiniões, tão necessárias à formação do pesquisador;

Ao prof. Dr. José Julio Costa Sidrim, mestre de todos que fazem o CEMM e com quem mantive o contato inicial quando essa pesquisa era simplesmente uma idéia, pela confiança e crédito no nosso trabalho;

À prof^a. Dr^a. Rda. Sâmia Nogueira Brilhante, minha orientadora, que me honrou ao ser seu primeiro mestrando, pelo profissionalismo e disposição incansáveis demonstrados ao longo da execução dessa pesquisa;

Ao prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, exemplo de ponderação e prova inequívoca da possibilidade de conciliar produção científica profícua e de elevado nível com espírito humanista;

À prof^a. Dr^a. Rossana Aguiar Cordeiro, pelas sugestões e intervenções pragmáticas, imprescindíveis para o bom desenvolvimento de qualquer trabalho científico;

Aos meus pais, Evando Moreira e Margarida Lopes Moreira, pelo estímulo e acesso à educação de qualidade que sempre me proporcionaram;

Aos colegas de Mestrado (Lydia Pantoja, Silviane Praciano, João Jaime Giffone, Luana Nepomuceno e Aracélia Gurgel) pelas oportunidades de compartilhamento de idéias e ansiedades no árduo caminho da formação científica;

Aos colegas médicos-legistas e aos auxiliares de perícia do IML de Fortaleza-CE, pelo denodo e colaboração na execução deste trabalho;

Aos colegas pesquisadores do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) que, pela diversidade de formações e manifesto espírito de corpo, permitiram expandir meus horizontes científicos;

Aos servidores do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, Terezinha de Jesus, Daniel Lima, Olavo Moraes e Ana Célia pela prontidão de seus préstimos, sempre que solicitados.

RESUMO

Com o evoluir das observações médico-legais, determinadas espécies de insetos e microrganismos foram descritos como indicadores de períodos da degradação do corpo. Entretanto, a literatura científica ainda é escassa no campo da Micologia Forense. Assim, investigaram-se as características microbiológicas dos fungos partícipes na mudança de flora *post mortem* em humanos, bem como estimou-se o valor da realização de exames micológicos no estudo cronotanatólogo. Foram realizadas um total de 400 coletas em 60 corpos humanos (34 do período gasoso, 06 do coliquativo e 20 do esqueletizado) examinados no Instituto Médico-Legal de Fortaleza e em cemitérios do Estado do Ceará. Foram realizados estudos macro/micromorfológicos e testes bioquímicos específicos para cada grupamento fúngico isolado. Aliado a tais análises, foi também realizado o teste da perfuração do pêlo *in vitro* em pêlos de cadáveres no período gasoso e em pêlos de adultos hígidos. Estas identificações foram realizadas no Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará. Com os resultados antropológicos, foi observado que o sexo masculino, dos 31 aos 40 anos, foi o mais comumente acometido, sendo a capital (Fortaleza) a mais envolvida no número de mortes. No período gasoso, dentre os fungos filamentosos identificados, foi observada a presença de quatro ordens: Eurotiales (63 isolados de *Aspergillus* spp e 21 de *Penicillium* spp), Mucorales (4 *Mucor* spp) e Hypocreales (2 *Acremonium* spp, 1 *Trichoderma* spp e 1 *Fusarium* spp) e Saccharomycetales (2 *Geotrichum* spp). No referente às leveduras, verificaram-se as ordens: Saccharomycetales (*Candida* spp 44) e Tremellales (*Trichosporon* spp 5). No período coliquativo, registraram-se as ordens: Eurotiales (*Penicillium* spp 2 e *Aspergillus* 2) e Hypocreales 1 (*Acremonium* spp). No referente às leveduras, isolou-se apenas a Ordem Saccharomycetales (*Candida* spp 3). No período de esqueletização, verificaram-se as seguintes ordens: Eurotiales (*Aspergillus* spp 22 e *Penicillium* spp 18), Mucorales (*Mucor* spp 10) e Hypocreales (*Acremonium* spp 2 e *Trichoderma* spp 1). No referente às leveduras, registraram-se duas ordens: Tremellales (*Trichosporon* spp 1) e Saccharomycetales (*Candida* spp 1). Quanto ao teste de perfuração do pêlo *in vitro*, a positividade foi observada no período gasoso, diferindo de adultos hígidos, em que foi negativa. Conclui-se que o estudo da Micologia Forense ainda é um campo rico em dados e que os fungos poderão vir a ser uma ferramenta complementar no estudo do tempo de morte em Medicina Legal.

PALAVRAS-CHAVE: Micologia Forense. Medicina Legal. Cronotanatologia.

ABSTRACT

With developing of forensic observations, certain species of insects and microorganisms were described as indicators of periods of the degradation of the body. However, the literature is still scarce in the field of Forensic Mycology. It was investigated the microbiological characteristics of fungi presence in the *post mortem* change, as well as, it esteemed the value of the mycology exams in the study. 400 collections was accomplished in 60 human bodies (34 of the bloated stage, 06 of the putrefaction stage and 20 of the skeletonization stage) at the Fortaleza city morgue and public cemeteries in the state of Ceará, The picked material was analyzed through macro/microcharacteristics and specific biochemical tests. Ally to such analyses, was also accomplished the test of the perforation of the hair *in vitro* in hair of corpses in the bloated stage and in hair of healthy adults. The material gathered was analyzed at the Specialized Medical Mycology Center of the Federal University of Ceará. With the anthropological results, it was observed that male, in the interval of the 31 to the 40 years, was more commonly attacked, being the capital (Fortaleza) the more involved in the number of deaths. In the bloated stage, among the identified filamentous fungi, the presence of four orders was observed: Order Eurotiales (63 isolated *Aspergillus* spp and 21 isolated *Penicillium* spp), Order Mucorales (4 *Mucor* spp), Order Hypocreales (2 *Acremonium* spp, 1 *Trichoderma* spp and 1 *Fusarium* spp) and Order Saccharomycetales (2 *Geotrichum* spp). In the yeast distribution, it was observed the orders: Saccharomycetales (44 *Candida* spp) and Tremellales (5 *Trichosporon* spp). In the putrefaction stage, it was isolated the following orders: Eurotiales (*Penicillium* spp 2 and *Aspergillus* 2) and Hypocreales 1 (*Acremonium* spp). Regarding the yeasts, it was just isolated the Order Saccharomycetales (*Candida* spp 3). In the eskeletonization stage, the following orders were observed: Order Eurotiales (*Aspergillus* spp 22 and *Penicillium* spp 18), Order Mucorales (*Mucor* spp 10) and Order Hypocreales (*Acremonium* spp 2 and *Trichoderma* spp 1). Regarding the yeasts, two orders were found: Tremellales (*Trichosporon* spp 1) and Saccharomycetales (*Candida* spp 1). In the hair perforation test *in vitro*, it was positive in the bloated stage, differing of healthy adults, where the test was negative. For conclusion, Forensic Micology is still a rich field in data and fungi can come to be a tool in the aid of human *post mortem* diagnosis.

KEY-WORDS: Forensic Mycology. Forensic Medicine. Time of death

LISTA DE FIGURAS

1	Cadáveres em períodos distintos de decomposição: A - Período gasoso; B – Período coliquativo e C – Período de esqueletização.....	18
2	Locais do estudo: A – IML / Fortaleza; B – Cemitérios públicos; C - CEMM.....	32
3	Biossegurança: utilização de equipamentos de proteção individual para colheita do material.....	35
4	Macromorfologia de fungo filamentosos: colônia arenosa de coloração negra <i>Aspergillus niger</i>	38
5	Conidióforo (A) e conídeos (B) de <i>Penicillium</i> sp.....	39
6	Isolamento primário de leveduras em ágar-Sabouraud.....	40
7	Microcultivo de leveduras em Corn meal Tween 80 – Presença de clamidoconídeos de <i>Candida albicans</i>	41
8	CHROMagar: <i>Candida albicans</i>	42
9	Teste de assimilação de nitrogênio.....	43
10	Fermentação de carboidratos.....	43
11	Perícia médico-legal no cemitério de Nova Jaguaribara-CE.....	46
12	Microscopia óptica do teste da perfuração do pêlo por <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> .(a) Pêlo perfurado do cadáver – Aumento de 40 X; (b) Pêlo perfurado da criança – aumento de 40X; (c) Pêlo não perfurado do adulto hígido – Aumento de 10X.....	57

LISTA DE TABELAS

1	Período gasoso: distribuição da amostra por idade, sexo e localidade....	47
2	Período coliquativo: distribuição da amostra por idade, sexo e localidade.....	50
3	Período de esqueletização: distribuição da amostra por idade, sexo e localidade.....	53
4	Teste da perfuração do pêlo <i>in vitro</i> com <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> : pêlo de cadáver, pêlo de criança pré-púbere (controle positivo) e pêlo de adulto hígido (controle negativo).....	58

LISTA DE GRÁFICOS

1	Período gasoso: sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas.....	49
2	Período gasoso: sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados.....	49
3	Período coliquativo: sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas.....	52
4	Período coliquativo: sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados.....	52
5	Período de esqueletização: sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas	55
6	Período de esqueletização: sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados.....	55
7	<i>Causa mortis</i> e ordens fúngicas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
IML	Instituto Médico Legal
UFC	Universidade Federal do Ceará
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
UECE	Universidade Estadual do Ceará
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
var.	Variedade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Revisão da literatura.....	15
1.1.1	Medicina Forense – Conceito e aspectos históricos.....	15
1.1.2	Tanatologia e cronotanatognose.....	16
1.1.3	Micologia Médica – Conceito e aspectos históricos.....	21
1.1.4	Microbiologia Forense.....	23
1.2	Perguntas de Partida.....	28
1.3	Hipóteses.....	29
1.4	Objetivos.....	30
1.4.1	Objetivo geral.....	30
1.4.2	Objetivos específicos.....	30
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1	Local do estudo.....	31
2.2	Desenho do estudo.....	31
2.3	Aspectos éticos.....	31
2.4	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	33
2.5	Cadáveres periciados.....	33
2.6	Critérios médico-legais de diagnóstico do intervalo <i>post mortem</i>.....	33
2.7	Critérios de inclusão dos cadáveres.....	34
2.8	Critérios de exclusão dos cadáveres.....	34
2.9	Preenchimento da ficha de campo com dados epidemiológicos.....	35
2.10	Biossegurança.....	35
2.11	Colheita das amostras.....	36
2.12	Procedimento laboratorial.....	37
2.12.1	Exame direto com microscopia óptica.....	37
2.12.2	Cultura do espécime clínico.....	37
2.13	Caracterização e identificação dos fungos filamentosos.....	38
2.13.1	Aspectos macromorfológicos dos fungos filamentosos.....	38
2.13.2	Aspectos micromorfológicos dos fungos filamentosos.....	38
2.13.3	Microcultivo em lâmina para fungo filamentoso.....	39
2.14	Caracterização e identificação das leveduras.....	40

2.14.1	Características macromorfológicas das leveduras.....	40
2.14.2	Características micromorfológicas das leveduras.....	41
2.14.3	Semeadura em CHROMagar- <i>Candida</i>	41
2.14.4	Exigências nutricionais e fisiológicas.....	42
2.14.4.1	Assimilação de nitrogênio.....	42
2.14.4.2	Fermentação de carboidratos.....	43
2.15	Teste da perfuração do pêlo <i>in vitro</i>	44
2.15.1	Seleção de cepas de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> e de uma cepa de <i>Trichophyton rubrum</i>	44
2.15.2	Execução do teste.....	45
2.16	Estoque das amostras	45
2.17	Colheita das amostras	46
3	RESULTADOS	47
3.1	Período gasoso	47
3.1.1	Distribuição das amostras por faixa etária, sexo e localidade	47
3.1.2	Análise laboratorial das amostras.....	48
3.1.3	Sítios de colheita e fungos isolados.....	48
3.2	Período coliquativo	50
3.2.1	Distribuição das amostras por faixa etária, sexo e localidade	50
3.2.2	Análise laboratorial das amostras.....	51
3.2.3	Sítios de colheita e fungos isolados.....	51
3.3	Período de esqueletização	53
3.3.1	Distribuição das amostras por faixa etária, sexo e localidade	53
3.3.2	Análise laboratorial das amostras.....	54
3.3.3	Sítios de colheita e fungos isolados.....	54
3.4	<i>Causa mortis</i>	56
3.5	Perfuração do pêlo	57
4	DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICES	84
	ANEXOS	89
	PUBLICAÇÕES	107

1 INTRODUÇÃO

A perícia médico-legal se reveste de importância ímpar no escopo de esclarecer um fato ou estabelecer a verdade para fins de prova no inquérito policial ou nas ações que instruem os processos judiciais. Tem como princípio a utilização de todo e qualquer conhecimento médico que tenha aplicação nas lides judiciárias. A determinação do tempo transcorrido entre a cessação das funções vitais e a análise pericial – o intervalo *post mortem* - não é tarefa de simples deliberação. Envolve a avaliação de vários critérios de natureza abiótica, tais como decréscimo de temperatura, alterações dos globos oculares, autólise e calcificação, bem como diversos critérios bióticos, exemplificados pela putrefação e saponificação. Além dos fatores bióticos citados, há que se destacar a interferência de insetos e microrganismos na participação do processo de decomposição cadavérica. Com o evoluir das observações médico-legais, determinadas espécies de artrópodes, bactérias e fungos foram descritas como indicadores de períodos da degradação do corpo. Apesar destas descrições, a literatura especializada ainda é escassa de dados relacionados com Microbiologia Forense, sendo o campo da Micologia Forense ainda repleto de lacunas que esclareçam o real papel dos fungos neste momento.

Um dos temas que carecem de aprofundamento e pode tornar-se alvissareiro é o da utilização de marcadores biológicos para caracterizar determinado período *post mortem* que tanto pode ser feito por meio de isolamento de certos microrganismos em meios de cultura como, possivelmente, pela demonstração de sua presença através de provas específicas (v.g., o teste da perfuração do pêlo *in vitro*).

É premente a execução de pesquisas em Micologia Forense, visto que tais estudos se juntarão aos instrumentos hodiernamente disponíveis para o esclarecimento de questões jurídicas de natureza penal e cível. Em face de tais circunstâncias, o estudo da Micologia Forense se somará ao conhecimento atual, a fim de estabelecer, com precisão, um intervalo temporal mais estreito do momento do óbito. É ponto passivo a necessidade de pesquisas com maior tamanho amostral, bem como melhor caracterização e identificação dos achados micológicos a fim de ratificar e estabelecer o real papel desses microrganismos como instrumental de uso rotineiro nas investigações médico-judiciais.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 Medicina Forense - Conceito e aspectos históricos

A Medicina Forense recebe várias sinonímias, cada uma revelando as diversas tendências com que ela é considerada em sua finalidade e em sua constituição. Dentre elas, destacamos: Medicina Legal, Medicina Judiciária, Medicina dos Tribunais ou Jurisprudência Médica. No mesmo caminho, inúmeros são seus conceitos, entre os quais citamos: “É a aplicação dos conhecimentos médicos às questões que concernem aos direitos e aos deveres dos homens reunidos em sociedade” (TOURDES apud FRANÇA, 2008).

É ciência de largas aplicações no interesse da sociedade em geral, e da Justiça em particular. Congrega conhecimentos de várias especialidades médicas e áreas afins como: Traumatologia/Ortopedia, Ginecologia/Obstetrícia, Psiquiatria/Psicologia, Toxicologia, Entomologia, técnicas laboratoriais de Anátomopatologia, Patologia Clínica e Microbiologia, além de interessar ao estudo da prova em grande número das disciplinas jurídicas (v.g., Direito Penal e Direito Processual Penal, Direito Civil e Direito Processual Civil). Não se ocupa do indivíduo apenas quando vivo. Alcança-o quando ainda zigoto e pode vasculhá-lo muitos anos depois na escuridão da sepultura (FRANÇA, 2008) em casos de exumação ou quando for necessária a presença do médico-legista no local de um fato criminoso (SANDÍ, 2006).

Sua história divide-se em cinco períodos: Antigo, Romano, Idade Média, Canônico e Moderno ou Científico. Este último se inicia no século XVII, mas foi somente no século XIX que os fatos suspeitados puderam, enfim, ser confirmados pelos exames necroscópicos (CROCE, 2004). No Brasil, a Medicina Legal se inicia mais tarde do que nos países europeus. Durante vários séculos, obedecemos à orientação intelectual e cultural portuguesa que, por sua vez, demorou a desenvolver seus estudos médico-legais. Em nosso País é dividida em três fases: estrangeira, de transição e de nacionalização. A primeira se inicia no período colonial e se estende até o ano de 1877 – caracterizando-se pela publicação de documentos médico-legais e por uma legislação ainda tênue quanto aos aspectos periciais. A segunda fase começa em 1877 e nela a Medicina Judiciária assume caráter eminentemente prático com a execução freqüente de necropsias e exames toxicológicos, dentre outros. A terceira fase se descortina em 1895 e se caracteriza pela fundação de escolas nacionais de

Medicina Legal mediante a atuação de professores como Nina Rodrigues, Afrânio Peixoto e Oscar Freire (GOMES, 2004).

Hoje, mais do que nunca, a Medicina Legal se apresenta como uma contribuição da mais alta valia e de proveito irrecusável. É disciplina de amplas possibilidades e de profunda dimensão pelo fato de não se resumir apenas ao estudo da Ciência Hipocrática, mas de se constituir da soma de todas as especialidades médicas acrescidas de fragmentos de outras ciências acessórias, destacando-se, dentre elas, a Ciência do Direito (FRANÇA, 2008). Uma de suas áreas de atuação de maior notoriedade na sociedade é a Tanatologia. Seu estudo assume importância ímpar no interesse das lides médico-judiciárias.

1.1.2 Tanatologia e cronotanatognose

A Tanatologia Médico-Legal, divisão que é da Medicina Legal Especial, ocupa-se dos fenômenos relacionados com a morte e sua aplicação no interesse da autoridade policial e judicial, ou seja, dedica-se ao estudo da morte em seus aspectos aplicáveis a lides jurídicas (CROCE, 2004; GOMES, 2004; DI MAIO, 1993). Procura compreender as causas e formas que põem termo à existência humana, os fatores que a influenciam, bem como os vários sinais e estudos complementares que possam corroborar seus achados - *v. g.* avaliações de métodos de imagem minimamente invasivos, como tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética, além de descrições microbiológicas (JACKOWSKI et al., 2005). Cuida da morte e do morto. Analisa os mais diversos conceitos de morte, o diagnóstico de morte, o tempo aproximado da morte (cronotanatognose), a morte súbita, a morte agônica e a sobrevivência; a necropsia médico-legal, a exumação e o embalsamento. E, entre outros assuntos, ainda analisa a causa jurídica da morte e as lesões *in vitam e post mortem* (FRANÇA, 2008).

Com o cessamento das funções vitais, são iniciados os chamados fenômenos cadavéricos. Tais fenômenos são conceituados como o conjunto de alterações de natureza física, química e biológica que promovem modificações irreversíveis nos tecidos orgânicos (AGUILERA, 1996). São sinais indiscutíveis de morte não recente e deles participam microrganismos, como bactérias e fungos, além de insetos necrófagos. A morte, como bem se conhece, possui diferentes agentes causais (de natureza interna ou externa) e, como processo que é, costuma ser dividido em períodos (FRANÇA, 2008) ou fases, como: período de coloração - caracterizado pelo surgimento da mancha verde abdominal, entre 16 e 24h *post mortem*, comumente na fossa ilíaca direita e difundindo-se, a partir de então, por todo o abdome, tórax, cabeça e membros. O início da mancha verde, via de regra, pela fossa ilíaca

direita, decorre da maior proximidade do ceco em relação à parede abdominal, além de ser a porção mais dilatada, com maior acúmulo de gases do intestino grosso e sede de intensa proliferação bacteriana. O tom esverdeado vai se tornando escuro em decorrência da combinação do hidrogênio sulfurado com a hemoglobina, formando a sulfometemoglobina. Observam-se, também, alterações de natureza eletrolítica em vários compartimentos do corpo, *e.g.*, o humor vítreo, já descrito em humanos e animais (GAIOTTO, 2003). Tais modificações ocorrem no intervalo de horas a poucos dias da avaliação *post mortem*; Período gasoso, deformativo ou enfisematoso - o enfisema putrefativo surge em razão do acúmulo de gases emanados do interior do corpo, que coalescem, produzindo um formato de bolhas epidérmicas de conteúdo líquido hemoglobínico. O cadáver aumenta de volume, em especial na face, no abdome e na genitália masculina, formando a clássica “posição de lutador” (Figura 1A). Verifica-se a projeção da língua e globos oculares, assim como intensa distensão abdominal onde pode ser observado timpanismo à percussão. Concomitantemente, esboça-se na derme o desenho vascular conhecido como “circulação póstuma de Brouardel”, em virtude do destacamento da epiderme e deslocamento do sangue para a periferia como consequência da pressão dos gases. Ocorre, via de regra, no período superior a 3 dias do cessamento das funções vitais (FRANÇA, 2008) e se estende por um período variável que pode alcançar semanas. A pele das mãos é objeto de um processo de destacamento da epiderme, no caso dos afogados, que pode ser utilizada para registro da individual dactiloscópica. As vísceras maciças passam por amolecimento e sua superfície de corte exhibe numerosas cavidades de pequeno porte (bem observadas no fígado e nos rins). O cérebro fica reduzido a uma massa acizentada, pegajosa, que escoia da cavidade craniana assim que é aberta (GOMES, 2004); Período coliquativo ou período de redução dos tecidos - caracteriza-se pela dissolução pútrida do cadáver cujas partes moles vão pouco a pouco se reduzindo de volume pela desintegração progressiva dos tecidos (Figura 1B). Os tecidos amolecem, reduzem seus volumes e, paulatinamente, transformam-se em uma massa pastosa, semilíquida, escura e de intensa fetidez, que se denomina putrilagem. O corpo vai perdendo sua forma originária, o tecido ósseo fica recoberto por uma massa da putrilagem, os gases se esvaem e surge um variado número de insetos. A fauna cadavérica auxilia grandemente na destruição total dos restos de matéria em decomposição, à qual consomem completamente (VANRELL, 2007). Sua evolução pode ocorrer de um a vários meses, conforme o local onde se encontra o cadáver (CAMPOS et al., 2000). No final do período coliquativo, a putrilagem escorre lentamente, infiltra no solo ou acaba por secar por evaporação, mostrando seus últimos restos e desfazendo-se em pó (VANRELL, 2007); Período de esqueletização - verifica-se a presença

de ossos quase ou completamente livres, presos somente pelos ligamentos articulares em conjunto com as vestes (Figura 1C). Em consequência da natural resistência do tecido ósseo, o processo pode ocorrer em anos e depende de fatores como a *causa mortis*, local do óbito e atuação da fauna cadavérica (GALVÃO, 2008).

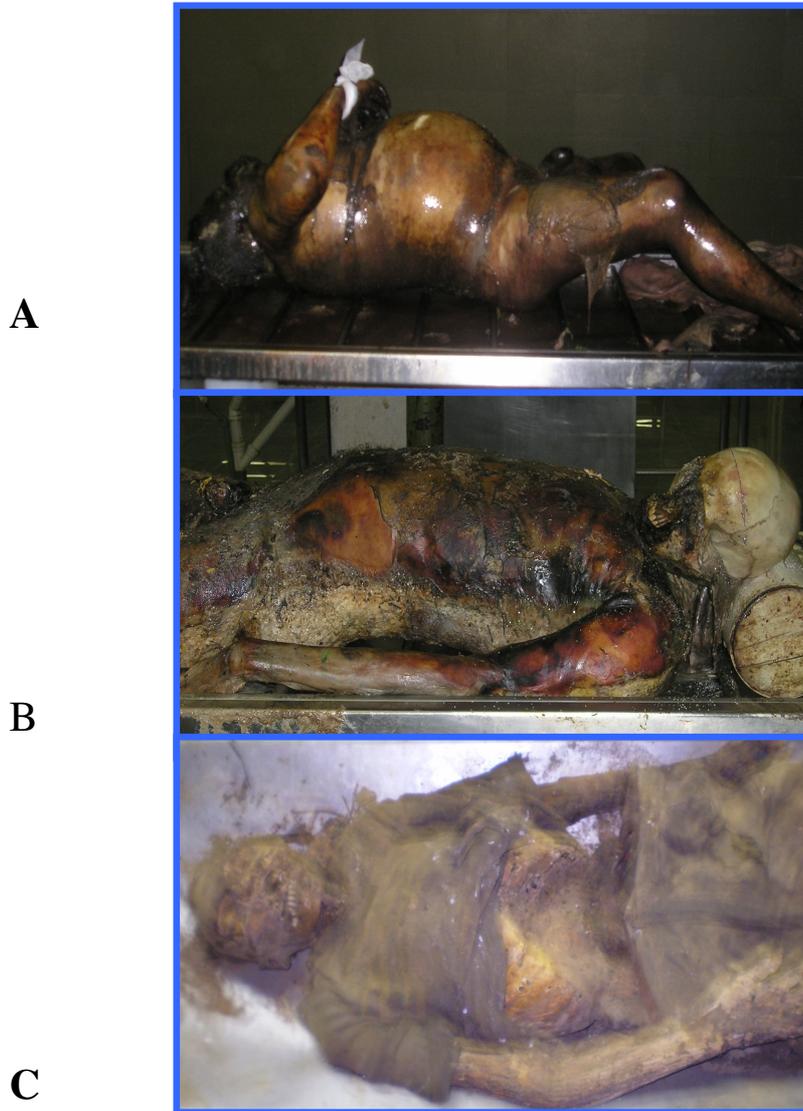


Figura 1 - Cadáveres em períodos distintos de decomposição: A – Período gasoso; B – Período coliquativo e C - Período de esqueletização

Um dos capítulos da Tanatologia tem como objeto de estudo o diagnóstico cronológico da morte, a chamada cronotanatologia ou cronotanatognose – que utiliza vários parâmetros, a fim de estimar o tempo decorrido entre o fenômeno da morte e os achados periciais. Com esse intuito, a tanatognose incorpora muitas técnicas de outros ramos e campos

de pesquisa como a Arqueologia, a Entomologia, a Botânica, a Química, a Ecologia e a Microbiologia dos solos, a fim de melhor analisar e situar os locais, clandestinos ou não, de inumação dos corpos, bem como seus respectivos processos de degradação (CARTER; TIBBETT 2003). A importância destes estudos reside mormente na solução de questões no âmbito cível ligadas ao direito das sucessões e ainda na determinação da responsabilidade criminal (FRANÇA, 2008; GOMES, 2004).

Chama-se cronotanatognose, tanatocronodiagnose ou diagnóstico cronológico da morte, o conjunto de técnicas médico-legais que visam a demonstrar o espaço de tempo verificado entre o cessamento das funções e a realização da análise pericial. Quanto mais largo esse espaço, de maior dificuldade se revestirá a perícia (FRANÇA, 2008). Estabelecer o intervalo *post mortem* é um dos maiores desafios que a Medicina Legal enfrenta ao deparar-se com um corpo em avançado estado de decomposição. Determinar o momento da morte pode significar a diferença entre contribuir com a distribuição da justiça ou permitir que um criminoso permaneça livre e torne a incorrer na sua conduta criminosa (COLLIER, 2005) ou, ainda, intervir com questões de sucessões nas causas cíveis, estabelecendo o diagnóstico de primoriência ou comoriência, é dizer, determinar a diagnose da ordem dos óbitos em situações de morte coletiva (*e. g.*, acidentes aéreos ou automobilísticos). Não se podendo verificar se algum dos comorientes precedeu aos outros, presumir-se-ão simultaneamente mortos – conforme disposto no artigo 8º do Código Civil Brasileiro de 2002 (BRASIL, 2008). É oportuno lembrar, ainda, a aplicação do tema nas seguintes situações criminais: no esclarecimento de chacinas, de pacto de suicídio e de homicídio mútuo (ALCÂNTARA, 2006). É matéria controversa e intrigante, haja vista a carência de método único com especificidade e sensibilidade suficientes para sua justa aferição.

O tema estudado pela cronotanatognose parece ser tão antigo quanto a Humanidade, uma vez que homicídios não são apanágio dos tempos modernos. Não obstante, embora fazendo uso de técnicas mais elaboradas, ainda não pode o médico legista, consciente de suas responsabilidades, precisar certa hora como aquela na qual ocorreu a morte. No máximo, deve fazer uma aproximação em um intervalo de tempo tão seguro quanto possível, de modo a incluir o real momento do óbito. Neste aspecto, é melhor ampliar a faixa e aderir à verdade do que ser vítima de um preciosismo irresponsável. Além do exposto, convém lembrar a necessidade, em caso de ser inquerido em um tribunal ou por juiz singular, de bem fundamentar as descrições, avaliações e conclusões periciais consignadas nos laudos e demais documentos médico-legais (GOMES, 2004).

Se o diagnóstico de morte é um capítulo rodeado de dúvidas e dificuldades (aspectos teológicos, científicos e filosóficos são levantados), muito mais é o que trata do tempo de morte. É, sem dúvida, dos assuntos mais complexos, e, por isso mesmo, entre mais instigantes da Medicina Legal (FRANÇA, 2008). Não significa dizer com isso que se deixe de fazer estudos ou executar perícias aprofundadas sobre o tema ou, ainda, que não se procure, dentro de uma análise comparativa dos diversos fenômenos, a aproximação de um tempo de morte. Na prática, poucos autores se dedicam ao estudo sistemático das variáveis de importância cronotanatológica. Pode-se inferir, mesmo, que a quantidade de literatura disponível para estimar o tempo de morte tem uma correlação reversa com sua relevância real (HENßGE; MADEA, 2004).

Embora vários métodos laboratoriais já tenham sido propostos, ainda há necessidade de maior exatidão, de técnicas mais fidedignas que possam tornar mais precisa tal determinação (COLLIER, 2005). Os fundamentos de tais técnicas amparam-se nas mudanças bruscas de metabolismo dos tecidos pela ausência de circulação e oxigenação adequadas, além da continuidade de certos processos vitais tissulares, a despeito de haver sido diagnosticada a morte cerebral e conseqüente parada cárdiorrespiratória. Inúmeros são os fenômenos cadavéricos estudados, porém seus resultados ainda se nos apresentam insuficientes para se determinar precisamente o tempo de morte, pois, como se sabe, ela se constitui num processo gradativo e não em um momento exato. Será necessário juntar todos os fenômenos de modo a estudá-los quase como uma síndrome – a “síndrome da morte”, cuja análise nos levaria a um valor aproximado (FRANÇA, 2008).

Uma das técnicas amplamente discutidas é a que faz uso dos estudos da Entomologia Forense. Essa ciência se fundamenta na presença de espécies diferentes de insetos que se sucedem nos períodos iniciais do processo de degradação cadavérica – período de coloração e período gasoso, uma vez ser o cadáver um sistema dinâmico capaz de suportar uma rica comunidade de artrópodes, a depender de fatores locais e das espécies de artrópodes necrófagos (PUJOL-LUZ et al., 2006). Em conformidade com os estudos pioneiros de Mégnin (FRANÇA, 2008), certas espécies desses animais chegam ao local da morte de acordo com um intervalo de tempo descrito (v.g., as espécies *Musca domestica*, *Muscina stabulans* e *Calliphora vomitoria* possuem um tempo de aparecimento que vai de 8 a 15 dias, permanecendo no sítio até o surgimento dos ácidos graxos) e pode-se observar variações se avaliados cadáveres expostos ao ar livre ou em cadáveres inumados. Embora Mégnin tenha dado um valor quase matemático à fauna cadavérica na cronologia da morte, pode-se afirmar que esses resultados têm valor aproximado, fornecendo dados fidedignos quanto mais

próxima estiver o momento da cessação das funções vitais. Há certos fatores que influenciam a chegada e colonização dos insetos. Entre esses, destacamos: clima (temperatura e umidade têm importância na composição da fauna), comportamento noturno (ovoposição noturna das moscas) e efeitos de drogas e tóxicos que reduzem a sobrevivência larval (FRANÇA, 2008; GOMES, 2004).

Não obstante, em intervalos de tempo de morte mais avançados, em fases adiantadas da decomposição, em que o substrato orgânico é reduzido ou em locais onde a presença de insetos não é observada, a Entomologia Forense não se presta a determinação cronotanatológica. Nesses casos, técnicas diversas são requisitadas como: a datação da velocidade de degradação do tecido ósseo ou de anexos da pele, a exemplo dos cabelos, ou, ainda, a determinação das espécies fúngicas presentes naquele instante e local onde o corpo foi localizado. Essas últimas ainda não possuem protocolo adequado, haja vista diversas técnicas citadas pelos autores – com sítios de coleta dos espécimes e técnicas de isolamento e identificação micológica laboratorial que diferem entre si - e exigüidade de casos descritos (VOORDEL; DIJCK, 1982).

1.1.3 Micologia Médica - Conceito e aspectos históricos

O termo Micologia, segundo Ainsworth (1976), em sua “Introdução à História da Micologia”, parece ter sido utilizado pela primeira vez pelo Rev. Miles Joseph Berkeley (1803-1889), em 1836, para designar o estudo dos microrganismos fúngicos (AINSWORTH apud LACAZ 2002). Em 1860, entretanto, o mesmo autor faz uso do vocábulo Fungologia, para o título de seu livro *Outlines of British Fungology* (LACAZ et al., 2002). São descritas mais de 50.000 espécies de fungos, nos mais variados sítios naturais, assumindo importância em processos patogênicos, assim como na degradação e reciclagem da matéria orgânica (MITCHELL, 2005). Uma de suas divisões, a Micologia Médica, é tida, classicamente, como parte de uma ciência mais ampla – a Microbiologia Médica - que, conforme sugere a etimologia, destina-se ao estudo da microvida, ou seja, dos microrganismos de interesse médico. Como divisão que é dessa, a Micologia ou Micetologia se dedica à classificação e caracterização de um grupo de organismos microscópicos - fungos, algas do gênero *Chlorella* e *Prototeca*, além de algumas bactérias como os actinomicetos. Os fungos, por sua vez, possuem organização celular e DNA limitado por dupla membrana envolvente (eucarióticos ou eucariontes), células com cerca de 1µm ou mais de diâmetro, divisão por mitose, parede

celular comumente quitinosa, aeróbios, heterotróficos, alguns com plasmídeos (a exemplo de certas espécies de leveduras). Esses microrganismos são, em sua maioria, exógenos e têm a água, o solo e os resíduos orgânicos como seu *habitat* natural. Os fungos exercem maior impacto econômico como fitopatógenos, destarte, a agricultura sofre enormes perdas anuais em decorrência de doenças fúngicas que acometem os vegetais.

Os fungos e seus metabólitos importam à Medicina sob vários aspectos, tais como: agentes infecciosos das micoses (expressão utilizada pela primeira vez, em 1856, por Rudolf Virchow), agentes de quadros de hipersensibilidade imediata ou tardia, agentes de micetismos, os quais são intoxicações causadas pela ingestão de fungos macroscópicos, tóxicos e como agentes de micotoxicoses, ou intoxicações causadas pela ingestão contínua e prolongada de alimentos contaminados por micotoxinas (LACAZ et al., 2002).

Com o surgimento do microscópio, no século XVII, uma ampla possibilidade de estudar o mundo dos microrganismos foi deslumbrada desde o desenho descritivo de Robert Hooke em 1665 de um “mofo”, no couro da capa de um livro, passando pelas primeiras descrições dos microrganismos como “animálculos” em 1677 (SUASSUNA, 2004). Foi necessário que o século XVIII se descortinasse para que Agostino Bassi – conhecido como o “Pai da Micologia Médica” – elaborasse pesquisas pioneiras com o fungo *Beauveria bassiana*, correlacionando-o como agente da doença do bicho-da-seda. Não obstante, é o médico Robert Remark, já no século XIX, que inicia a Micologia Médica humana propriamente dita, com seus estudos do fungo que denominou *Achorion schoenleinii*. Por quase 50 anos do século XIX, as pesquisas dos agentes fúngicos foram embotadas pelo espantoso aprimoramento que desenvolveu a Bacteriologia com destaque para nomes como: Louis Pasteur, Robert Koch e Émile Roux. Já ao findar da citada centúria, em 1892, o médico Raymond Jacques Adrien Sabouraud iniciou seu trabalho com fungos, em especial os dermatófitos, que culminaram em um marco da Ciência Micológica: a publicação do livro *Les Teignes*. Além disso, confeccionou o meio de cultura ágar-Sabouraud – utilizado até nossos dias - com modificações, em rotinas laboratoriais de Micologia Médica (SIDRIM, 2004). Convém lembrar que, ainda no século XIX, surge a descrição da primeira correlação de um fungo causador de micose profunda com o quadro clínico humano - realizada por Rudolf Virchow em um caso de aspergilose pulmonar.

Ao longo da centúria passada, várias tentativas de uniformização taxonômica foram feitas, com destaque na sua primeira metade, para os dermatófitos. Inúmeros pesquisadores nacionais e internacionais promoveram substanciais contribuições para o desenvolvimento da Micologia Médica como a conhecemos hoje, com destaque para nomes

como: Ricardo Negroni, Patrick Boiron, Alberto Londero, Carlos da Silva Lacaz, entre outros (LACAZ, 1983).

No Brasil, é considerado o “pai da Micologia” (estudioso, principalmente, dos basidiomicetos) o padre jesuíta austríaco Johannes Evangelista Rick, de fama internacional e que trabalhou como sacerdote, teólogo e cientista em São Leopoldo (Rio Grande do Sul). São dignas de destaque, ainda, as doenças de interesse da Micologia que tiveram seus agentes descritos pela primeira vez no Brasil, entre as quais mencionamos: paracoccidioidomicose, doença de Jorge Lobo, a cromomicose, a *piedra preta*, a *tinea nigra* e alguns agentes de eumicetomas e de hialohifomicoses (LACAZ et al., 2002).

Apenas algumas centenas de espécies foram implicadas como causadoras de doenças humanas, visto que, 90%, das micoses humanas podem ser atribuídas a algumas dúzias de fungos. Na maior parte dos casos clínicos, são desenvolvidas infecções oportunistas em portadores de graves doenças adjacentes, usuários de imunodepressores e/ou com comprometimento das defesas imunológicas, embora possíveis infecções desses agentes infecciosos possam, também, comprometer imunocompetentes (MITCHELL, 2005).

Apesar da evidente evolução da Micologia Médica, em especial no século XX, no que concerne ao isolamento e participação dos fungos como agentes etiológicos em vários quadros nosológicos da clínica médica humana e veterinária; ainda é tênue a descrição da associação desses microrganismos ao curso da putrescência, é dizer, na evolução da degradação cadavérica.

1.1.4 Microbiologia Forense

A Microbiologia, em suas divisões clássicas (Bacteriologia, Virologia e Micologia), tem possibilitado o esclarecimento de diversas questões de interesse nas lides dos tribunais. Diversos pesquisadores já se dedicam à aplicação da Bacteriologia Forense com o intuito de esclarecer questões de interesse médico e jurídico. Entre outros, destacamos: o isolamento de microrganismos bacterianos em vítimas de afogamento e sua correlação com o local e tipo de água – doce ou salgada de ocorrência do sinistro (LUCCI; CIRNELLI, 2007), a avaliação *post mortem* do metabolismo realizado por microorganismos como *Streptococcus faecalis* e *Clostridium perfringens* de psicotrópicos, como clonazepan, nitrazepan e flunitrazepan – entre outros nitrobenzodiazepínicos relevantes nos estudos de Toxicologia Forense (ROBERTSON; DRUMMER, 1995), o valor pericial de culturas bacterianas *post mortem* com o propósito de avaliar a qualidade dos testes diagnósticos e intervenções

terapêuticas aos quais foram submetidos os pacientes, previamente ao óbito (TSOKOS et al., 2001) – o que pode prover esclarecimentos em questões de responsabilidade civil dos médicos assistentes e na Odontologia Legal (LESTER; BURKET, 1942) ou a correlação de infecções prévias e o diagnóstico *post mortem* por meio de hemoculturas bacterianas ou de cultura de líquido cefalorraquidiano (LCR) com o escopo de estabelecer a *causa mortis* em crianças no período neonatal, infantes ou em adultos (MORRIS et al., 2006). Esses últimos autores demonstraram que a translocação bacteriana *post mortem* possui pouca ou nenhuma interferência nas culturas de sangue e LCR, desde que o corpo cadavérico seja adequadamente acondicionado após constatado o óbito e não ocorra contaminação no manuseio laboratorial do material. De forma desigual, ainda são incipientes, na literatura especializada, os estudos de Virologia *post mortem* e sua aplicação forense. Apesar disso, os congressos de Patologia Humana têm movido esforços com o propósito de melhor conhecer e abordar o tema (INTERNATIONAL ACADEMY OF PATHOLOGY, 2007).

Diversamente dos estudos em Virologia, auferem destaque, nas últimas décadas, os estudos sobre o relevante papel dos fungos na decomposição do cadáver, uma vez ser o corpo cadavérico uma copiosa fonte de matéria orgânica (ISHII, 2006), aumentando as descrições experimentais e estudos de casos em Micologia Forense (VOORDEL; DIJCK, 1982; CARTER; TIBBETT, 2003; HITOSUGI et al., 2006). Esses estudos demonstram que certos grupos desses microrganismos (*e.g.*, Zygomycetos e Basidiomicetos), conhecidos como fungos da pós-putrefação, podem ter destaque na estimativa do tempo transcorrido entre a morte e a avaliação pericial. Esses grupos liberam amônia (NH₃) e apresentam estruturas de frutificação (esporos ou conídeos) ao longo das modificações sofridas pelo substrato orgânico cadavérico. DeGaetano observou as modificações capilares (formação de túneis nos cabelos) (DeGAETANO, 1992 apud CARTER; TIBBETT, 2003), Hackett, as ósseas (surgimento de túneis nos ossos) (HACKETT, 1981 apud CARTER; TIBBETT, 2003) e Janaway, as das vestes (degradação) (JANAWAY, 2001 apud CARTER; TIBBETT, 2003) geradas por fungos e outros microrganismos.

A sucessão de frutificação e emprego do nitrogênio promove as bases da estimativa do intervalo *post mortem* e a sucessão de crescimento fúngico. A avaliação de aspectos ecológicos e fisiológicos desses fungos é importante na determinação do local do óbito - haja vista diferenças geoclimáticas entre as regiões do globo terrestre - e do tempo transcorrido. Embora sua relação ainda não esteja completamente esclarecida, haja vista a reduzida bibliografia tratando do tema, Carter e Tibbett (2003) destacam dois agrupamentos fúngicos relacionados ao estado de frutificação ao longo da decomposição cadavérica: fungos

de frutificação precoce (Zygomycetos, Deuteromicetos e Ascomycetos) e fungos de frutificação tardia (Basidiomicetos).

Embora os citados autores tenham feito descrições sobre a participação dos fungos no processo de morte, poucos têm se ocupado em promover discussões acerca das espécies partícipes em cada fase do intervalo *post mortem* e sua possível aplicação nos estudos de cronotanatognose.

Além do exposto, o isolamento de certas espécies fúngicas, em determinadas áreas geográficas, também se presta a colaborar com a caracterização e classificação dos microrganismos típicos de certa região, haja vista a variação de espécies em contato com os cadáveres descritos pelos autores sob diferentes condições de crescimento (ISHII et al., 2007; VOORDEL; DIJCK, 1982).

O termo Micologia Forense é de uso recente e designa o estudo das espécies de fungos que possuem interesse na aplicação da Medicina Legal – com destaque para a determinação dos grupos fúngicos que participam do processo de degradação orgânica como: Zygomycetos (v.g., *Rophalomyces strangulatus*), Basidiomicetos (v.g., *Hebeloma vinosophyllum*, *Laccaria amethystine*) e Ascomycetos (v.g., *Ascobolus denudatus*, *Coprinus neolagopus*) CARTER; TIBBETT, 2003) - corroborando, em associação com outros elementos, na determinação do intervalo *post mortem* (VIEGAS, 2006). Conforme já referido, a utilização da descrição dos insetos partícipes da degradação cadavérica, em suas legiões de sucessão, como marcadores do tempo de morte já se encontra bem descrito na literatura especializada. Não obstante, convém lembrar que certas condições de temperatura e umidade podem tornar improfícuos os estudos de Entomologia Forense, dando lugar, dessa forma, à aplicação da Micologia Forense.

Isso posto, convém recordar que autores como Hitosugi (2006) ratificam que os fungos podem se tornar um instrumento útil com o propósito de estabelecer o intervalo *post mortem* quando a Entomologia Forense não se aplica e que estudos mais amplos são necessários a fim de tornar clara a sucessão de colonização fúngica ocorrente nos cadáveres humanos. De mais a mais, autores como Menezes et al. (2007) mostram-se categóricos quando se ressentem da ínfima quantidade de dados disponíveis e descritos pelos autores, com amostras ainda reduzidas, em suas publicações.

Além dessa possibilidade, é possível correlacionar achados de isolamento fúngico em corpos esqueléticos, a fim de adicionar elementos que contribuam com a identificação e tempo de decomposição – associado a estudos arqueológicos e de Odontologia-Legal (OLIVEIRA et al., 2004). Encontram-se relatos de alguns gêneros fúngicos como

frequentemente encontrados em perícias quando da realização de necrópsias de interesse jurídico, como: *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Mucor* spp (ENTORNO MÉDICO, 2008). O conhecimento dos gêneros e espécies fúngicas próprias de cada fase da decomposição, além de servir aos interesses das lides jurídicas, também se presta a melhor compreender o metabolismo e hábitos nutricionais de cada espécie isolada, objeto típico do estudo da Micologia Geral.

O adequado diagnóstico micológico, essencial para a aplicação da Micologia Forense, envolve várias etapas, que devem ser rigorosamente executadas, sob pena de impossibilitar o preciso isolamento dos microrganismos fúngicos de interesse médico-legal. A etapa inicial envolve a avaliação pericial forense com o intuito de estabelecer, de acordo com critérios de uso corrente na Medicina Judiciária (v.g., odor fétido, presença de insetos, exposição de tecidos moles ou ósseo), o período ou intervalo *post mortem* que se pretende apreciar. Conforme o previamente exposto, contudo, tais critérios isoladamente não promovem a precisão necessária aos interesses judiciais e devem, desse modo, ser avaliados em conjunto e concomitantemente aos achados periciais (KRYMCHANTOWSKI et al., 2006).

Uma outra vertente, passível de ser explorada nos estudos de Micologia Forense, trata da utilização de testes laboratoriais específicos que visam demonstrar a presença de certa espécie fúngica no processo de degradação cadavérica. Nesse sentido, citamos o teste da perfuração do pêlo *in vitro*.

É oportuno lembrar que em cada uma das fases ou períodos *post mortem* podem ser isoladas distintas espécies micológicas, de sorte que, é de suma importância para o processamento laboratorial a disponibilidade de dados periciais que possam orientar o micologista forense no curso dos procedimentos de isolamento dos microrganismos, conforme ocorre com os isolados clínicos hospitalares nos quais a interlocução médico-assistente e micologista deve constituir uma rede de conhecimento sólido e contínuo para ambas as partes (SIDRIM et al., 2004a).

Superada essa etapa, impõe-se a necessidade de vasculhar-se os sítios anatômicos onde há maior possibilidade de detectar-se a presença de fungos. Esses locais são eleitos tendo como fundamento a microbiota do hospedeiro-cadáver que tende a se expandir em velocidade exponencial, haja vista a ausência das barreiras imunológicas presentes no hospedeiro-vivo. Além da disseminação *post mortem* desses microrganismos endógenos com a simultânea competição entre fungos, bactérias, vírus e protozoários, convém ter em mente o

surgimento de fungos anemófilos que se instalam na superfície ao longo do processo de decomposição cadavérica (ISHII et al., 2007).

Entre os sítios anatômicos de coleta ordinariamente utilizados para diagnóstico micológico laboratorial, citamos: pêlo do couro cabeludo (em suas porções proximal e distal), escamas de pele, unhas, mucosa oral, mucosa retal, genitália (sulco balanoprepucial e vagina), pulmão, tecido ósseo, líquido cefalorraquidiano, sangue periférico, medula óssea, urina, fezes, escarro, conjuntiva e córnea (SIDRIM et al., 2004a). É importante ressaltar ainda que, nas investigações médico-legais, reveste-se de importância, além dos sítios já citados, a avaliação do solo do local onde o corpo foi encontrado, assim como as vestes e mesmo fragmentos do féretro (em casos de inumação prévia), em situações nas quais o material orgânico disponível para avaliação laboratorial é escasso, como se observa no período de esqueletização da degradação cadavérica (FRANÇA, 2008). Nessa fase em particular, autores como Hackett (1981) há muito demonstraram a interferência do crescimento fúngico no processo de degradação capilar e das estruturas ósseas, tornando-se, dessa forma, potenciais marcadores do tempo de decomposição cadavérica.

Não se pode olvidar, ainda, o fato de ser de fundamental importância que a quantidade de material coletado para ulterior processamento laboratorial deve ser adequada para os fins do isolamento fúngico, sob pena de ser necessária nova colheita em face de material impróprio ou em volume insuficiente quando da sua chegada ao laboratório de Micologia. Não obstante, é preciso manter em mente a noção de que em Medicina Forense, não raras vezes a oportunidade para colheita do material é única, porquanto a degradação posterior desse material pelos fenômenos cadavéricos torna impraticável nova colheita (GOMES, 2004). O brocardo jurídico que ensina que “perícia mal feita não há como ser refeita”, bem se aplica ao processo de colheita de material para as lides forenses, o que pode significar a insolubilidade de certo questionamento de interesse jurídico. Isso posto, o momento da retirada do material do seu sítio natural se reveste de importância ímpar para o adequado manejo sucessivo na fase laboratorial propriamente dita da Micologia Forense.

Em face do exposto, é mister reconhecer que a literatura médico-legal, bem como a literatura micológica carecem de dados com maior consistência que possam embasar e fomentar a utilização rotineira de dados da Micologia Forense, a exemplo da Entomologia Forense, na rotina das perícias que possuem o desígnio de estabelecer o intervalo de tempo (cronotanatognose) que percorre entre o cessamento das funções vitais e a efetiva realização da perícia médico-judicial.

1.2 Perguntas de partida

Em razão do exposto, surgem as indagações:

- A dinâmica da microbiota fúngica, associada a parâmetros cronotanatólogicos, serve como processo inovador no diagnóstico do intervalo *post mortem*?
- O teste da perfuração do pêlo *in vitro* pode ser utilizado como possível marcador do intervalo *post mortem*?

1.3 Hipóteses

- O estudo da sucessão da microbiota fúngica, em associação com outros parâmetros cronotanatólogicos, auxilia no diagnóstico do intervalo *post mortem*.
- O teste da perfuração do pêlo *in vitro*, associado com os demais critérios das perícias médico-judiciais, facilita o diagnóstico do intervalo *post mortem*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

- Com este estudo buscar-se-á melhor compreender a Micologia Forense ao investigar as características microbiológicas dos grupos de fungos partícipes da flora *post mortem* e do processo de degradação cadavérica.

1.4.2 Objetivos específicos

- Correlacionar as espécies de fungos isoladas com dados antropológicos no que se refere à idade, ao sexo do cadáver e áreas anatômicas mais acometidas;
- Investigar a existência de elementos determinantes na estimativa do tempo decorrido de morte (cronotanatognose) por meio do estudo da população micológica envolvida no processo de desagregação do cadáver humano, correlacionando os microrganismos encontrados com o intervalo *post mortem* verificado mediante outras variáveis de utilização médico-legal;
- Avaliar a aplicação do teste da perfuração do pêlo *in vitro* em perícias tanatológicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi realizado em três locais:

1) Instituto Médico-Legal (IML) de Fortaleza – Ceará: No IML (Figura 2A), os corpos foram avaliados quando da sua chegada ao necrotério da instituição e antes de serem depositados no setor de armazenamento dos mesmos;

2) Em cemitérios públicos: Nas necrópoles (Figura 2B), os corpos periciados, no período de esqueletização e no período coliquativo da degradação cadavérica, foram exumados por médicos legistas e auxiliares de perícia;

3) Laboratório de Micologia do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM - Figura 2C), do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará (UFC): No CEMM foi realizada a análise laboratorial do material colhido e feito isolamento dos grupos fúngicos partícipes da degradação cadavérica.

2.2 Desenho do estudo

O estudo foi do tipo transversal, com observação dos dados antropológicos e médico-legais dos em cadáveres examinados no IML de Fortaleza e em cadáveres exumados, assim como laboratoriais dos espécimes fúngicos partícipes do processo.

2.3 Aspectos éticos

O estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará (UECE) – haja vista tratar-se o Instituto Médico Legal de órgão da administração pública estadual e de a instituição não dispor, à época, de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O projeto obteve parecer favorável à execução, sem alterações, sob o número 064969333-9 – FR CONEP 118526 (Anexo G). Concomitantemente, a administração do IML do município de Fortaleza teve ciência de todas as etapas da execução da pesquisa e autorizou a sua realização (Apêndice A).



Figura 2 - Locais do estudo: A – IML / Fortaleza; B – Cemitérios públicos; C - CEMM

2.4 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

A investigação foi procedida em conformidade com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96 que trata da pesquisa envolvendo seres humanos (*in anima nobili*), que recomenda *in verbis* “consentimento livre e esclarecido dos indivíduos-alvo e a proteção a grupos vulneráveis e aos legalmente incapazes (*autonomia*). Neste sentido, a pesquisa envolvendo seres humanos deverá sempre tratá-los em sua dignidade, respeitá-los em sua autonomia e defendê-los em sua vulnerabilidade;” e, ainda, “Exige-se que o esclarecimento dos sujeitos se faça em linguagem acessível”, foi elaborado um documento com o escopo de ser avaliado pelos responsáveis legais pelos sujeitos do estudo (cônjuge, filhos, outros componentes familiares ou a administração do Instituto Médico-Legal de Fortaleza) que foram minuciosamente informados a respeito da pesquisa e seus objetivos e assinaram incontinenti, após seu livre convencimento, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – (Apêndice B).

2.5 Cadáveres periciados

Foram analisados cadáveres humanos nas três fases *post mortem* delineadas pelo estudo. Cada cadáver foi avaliado previamente a fim de estabelecer o diagnóstico do intervalo pós-morte, mediante critérios de uso cediço nas perícias médico-legais. Todos os corpos foram periciados no período de janeiro a dezembro de 2007.

2.6 Critérios médico-legais de diagnóstico do intervalo *post mortem*

Com o propósito de caracterizar a fase do intervalo *post mortem* na qual foi realizada a colheita do material para análise micológica, foram utilizados critérios de uso comezinho nas perícias médico-legais (FRANÇA, 2008; GOMES, 2004), para cada um dos períodos avaliados, como: Período gasoso, o qual se caracterizou por odor fétido, protusão da língua e globos oculares, descolamento da epiderme com perda dos fâneros – pêlos, unhas e cabelos - amolecimento das vísceras – em especial, encéfalo, fígado e rins - infiltração e distensão gasosa dos tecidos; Período coliquativo, o qual foi descrito com o desaparecimento do enfisema gasoso com incontinenti deliquescência dos tecidos, grandes perdas líquidas e presença da fauna cadavérica característica; Período de esqueletização, demonstrado com a

completa exposição do tecido ósseo com estruturas articuladas apenas pelos apêndices ligamentares (Anexo A).

2.7 Critérios de inclusão dos cadáveres

O estudo estabeleceu os seguintes critérios de inclusão que guiaram a seleção dos cadáveres e respectivas coletas:

1. Cadáveres que se encontravam, caracteristicamente, em uma das fases *post mortem* delimitadas pelo estudo, periciados por legistas do IML de Fortaleza - CE;
2. Cadáveres de ambos os sexos definidos pelo exame da genitália externa;
3. Faixa etária compreendida entre os maiores de 18 anos e os menores de 60 anos;
4. Vítimas de morte violenta ou resultante de ação externa por homicídio, suicídio ou infortúnio (acidentes de trânsito, choque elétrico, afogamento, traumas mecânicos, queimaduras, entre outros) (DOUGLAS et al., 2003).

2.8 Critérios de exclusão dos cadáveres

A pesquisa obedeceu aos critérios de exclusão dos cadáveres a seguir expressos:

1. Cadáveres vítimas de morte natural por microrganismos, a fim de evitar possíveis vieses de contaminação e interferência no isolamento fúngico;
2. Cadáveres com diagnóstico controverso do período de decomposição, com o escopo de caracterizar, com a máxima fidelidade, o período de degradação em estudo;
3. Não observância do protocolo de pesquisa;
4. Não autorização de participação no estudo;
5. Gestantes – com o intento de evitar a interposição dos tecidos e anexos fetais como possível fator de confusão.

2.9 Preenchimento da ficha de campo com dados epidemiológicos

A fim de obter dados de interesse epidemiológico que pudessem auxiliar os achados laboratoriais, foi aplicada uma ficha de campo (Apêndice D) com o escopo de lograr dados de cada coleta, realizada. Data da perícia (mês e ano); sexo determinado do periciado; idade por faixas e em anos; procedência do corpo (Fortaleza ou interior do estado); período ou fase do intervalo *post mortem* no qual ocorreu a perícia; local onde foi encontrado o corpo (cova rasa, jazigo, exposto em meio aquático ou exposto em meio terrestre); *causa mortis* (suicídio, infortúnio, homicídio ou indeterminada); possível contato com animais (aquáticos, silvestres ou domésticos) (Apêndice C).

2.10 Biossegurança

Foi de suma importância o adequado manejo das amostras colhidas. Isso posto, foi observado, de forma intransigente, o máximo de cautela no momento da retirada e transporte do material biológico. Com o intuito de preservar a segurança da colheita do material a analisar, assim como resguardar a higidez do pesquisador, foram utilizados equipamentos para proteção individual, como máscara com filtros biológicos, gorro descartável, propés descartáveis, avental descartável, bem como luvas estéreis e descartáveis (BRUNICARDI et al., 2006) (Figura 3).



Figura 3 - Biossegurança: utilização de equipamentos de proteção individual para colheita do material

2.11 Colheita das amostras

A colheita do material foi a etapa inicial do diagnóstico laboratorial e executada sob todo o rigor técnico, sob pena de tornar improficuo todo o processamento laboratorial que se seguiu, com geração de resultados falsos. Após o preenchimento da ficha com os dados de interesse epidemiológico, foi realizada a colheita de material orgânico cadavérico em sítios anatômicos onde era maior a probabilidade de evidenciar-se crescimento fúngico: cavidade oral, ampola retal, mucosa vaginal, sulco balanoprepucial, brônquios pulmonares principais, pele, pêlos do couro cabeludo, vestes (de material sintético ou algodão) e do ambiente (solo do jazigo e fragmento do féretro).

Para cada sítio de colheita eleito, foi utilizada técnica própria a seguir descrita, conforme Sidrim et al. (2004a). 1) Pele: após exame visual da área a ser colhida, foi utilizada uma lâmina de bisturi estéril, número 12, sem o fio de corte. Realizou-se, então, a raspagem vigorosa da área cutânea. O material colhido foi acondicionado em pequenas placas de Petri (60 x 15 mm) previamente esterilizadas no CEMM e remetidas, imediatamente, para o processamento laboratorial; 2) Pêlos do couro cabeludo: foram colhidos em duas regiões - porção proximal e porção distal. A primeira foi removida por arrancamento de dentro do folículo piloso, com o auxílio de uma pinça de dissecação estéril. A segunda região foi colhida por meio de tesoura estéril com corte do segmento distal do pêlo; 3) Mucosas e orifícios naturais (mucosa gengival, mucosa retal, mucosa vaginal e sulco balanoprepucial): foi utilizado *swab* estéril com movimentos rotacionais em sentido horário e colhidas duas amostras – uma para o exame direto com KOH a 40% e a outra para cultura em ágar-Sabouraud. No caso particular do sítio vaginal, foi colhida amostra do fundo de saco vaginal; 4) Sítios pulmonares: foram realizadas biópsias com o auxílio de lâminas de bisturi estéreis, número 12, bem como, retirada de fragmento único de 1,0 cm de comprimento em brônquio pulmonar principal; 5) Vestes, solo pericadavérico e segmentos do féretro utilizado na inumação com o intuito de caracterizarmos o ambiente cadavérico no período esqueletizado, quando o material orgânico disponível se torna escasso. Todas as amostras foram dispostas, incontinentemente, em meio adequado para o transporte, que consistiu em tubo de ensaio com 2 ml de solução salina a 0,9%, em temperatura de 25 a 28 °C, previamente preparadas e esterilizadas, acondicionadas em caixa térmica de isopor e conduzidas em até 24 horas para o CEMM da Universidade Federal do Ceará (Vide fluxograma da pesquisa).

2.12 Procedimento laboratorial

2.12.1 Exame direto com microscopia óptica

Uma vez trazidas ao laboratório do CEMM, o procedimento inicial consistiu no processamento de pequenas alíquotas do material coletado com o escopo de serem visibilizadas ao exame microscópico óptico. Tal material foi depositado sobre uma lâmina de vidro, previamente identificada, e acrescida de duas a três gotas de hidróxido de potássio a 40% (agente clarificador), coberta com uma lamínula e levada ao microscópio óptico a fim de verificar a presença ou ausência de estruturas fúngicas e/ou contaminantes. Foram utilizadas objetivas com aumento de 10X e 40X. Adotou-se, como critério de positividade desse exame, a visualização de hifas (hialinas ou demáceas), pseudo-hifas ou blastoconídeos (MILAN; ZAROR, 2004; SIDRIM et al., 2004a).

2.12.2 Cultura do espécime clínico

Em conjunto com o exame direto, realizou-se semeadura em meio de cultura, mediante uma alíquota do material em placas de Petri médias (medindo 90 x 15 mm), contendo ágar Sabouraud 2% de glicose, ágar Sabouraud com vancomicina (100 mg/ml) (Anexo B) + polimixina B (16 mg/l) (Anexo C) (a fim de reduzir o crescimento de bactérias contaminantes Gram positivas e Gram negativas, respectivamente) e ágar Sabouraud com vancomicina (100 mg/ml) + polimixina B (16 mg/l) + cicloeximida (com o intuito de inibir bactérias contaminantes e fungos oportunistas).

Vencida essa etapa, as placas foram incubadas a temperatura de 25 a 28 °C, por um período de até vinte (20) dias, com observações diárias, até que se detectasse o crescimento e a maturação das colônias fúngicas. A partir do desenvolvimento cultivado das colônias, as culturas foram repicadas em ágar-batata para posterior identificação das espécies (Vide fluxograma da pesquisa).

2.13 Caracterização e identificação dos fungos filamentosos

2.13.1 Aspectos macromorfológicos dos fungos filamentosos

Quanto à caracterização macromorfológica (Figura 4) foram consideradas as seguintes propriedades distintivas: tamanho (variável, a depender da quantidade e qualidade do substrato oferecido); bordas (projeções e coloração variável, de desenhos bem delimitados a franjas irregulares); textura (algodonosa, fufurácea, penugenta, arenosa, veludosa, glabrosa); relevo (cerebriforme, rugosa, apiculada, crateriforme) e pigmentação (superfície, reverso, se difusível ou não no meio) (SIDRIM; ROCHA, 2004).



Figura 4 - Macromorfologia de fungo filamentosos: colônia arenosa de coloração negra *Aspergillus niger* Fonte: CEMM – 2008

2.13.2 Aspectos micromorfológicos dos fungos filamentosos

Foram avaliadas as estruturas de frutificação e ornamentação, uma vez que são essas as responsáveis pela diferenciação da maioria das espécies dos fungos filamentosos. As estruturas de frutificação foram consideradas como células componentes das hifas objeto de modificação, sob certas condições do meio, para darem origem a dois tipos celulares primários: células esporogênicas e células conidiogênicas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

No que diz respeito às estruturas de ornamentação, foram consideradas como apêndices da hifa que se apresentam sob várias formas e que não possuem função conhecida

para a biologia do fungo. Isso posto, as características micromorfológicas foram analisadas pela técnica a seguir descrita.

2.13.3 Microcultivo em lâmina para fungo filamentososo

Essa técnica foi executada com o escopo de avaliar as estruturas micromorfológicas – frutificação e/ou ornamentação (Anexo E). Foram preparadas placas de Petri, previamente identificadas, contendo uma lâmina de vidro apoiada sobre um suporte que posteriormente foi recoberta com lamínula – todo o aparato montado em condições estéreis (SIDRIM; ROCHA, 2004). A título de exemplo, demonstramos alguns achados de microcultivo de *Penicillium* sp (Figura 5).

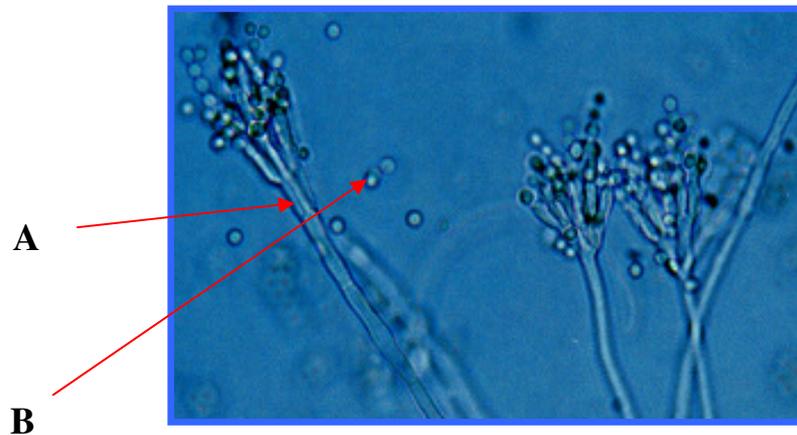


Figura 5 – Conidióforo (A) e conídeos (B) de *Penicillium* sp
Fonte: CEMM – 2007

2.14 Caracterização e identificação das leveduras

As leveduras, consideradas como forma assexuada da divisão fúngica unicelular com núcleo único, foram identificadas por meio da avaliação macromorfológica e micromorfológica das colônias (Anexo E), bem assim com a execução de provas bioquímicas, quando necessárias, para melhor caracterização do microrganismo (Anexo F).

2.14.1 Características macromorfológicas das leveduras

Foram consideradas colônias de leveduras as que apresentaram as seguintes características ao isolamento primário com ágar-Sabouraud e secundário com ágar-batata: colônias glabras, de coloração branca ou bege, textura cremosa e superfície lisa (Figura 6). O isolamento secundário em tubos de ensaio previamente identificados e contendo ágar-batata justifica-se pelo crescimento concomitante com bactérias e outros contaminantes na cultura primária em ágar-Sabouraud. Das colônias cujo crescimento em ágar-Sabouraud e ágar-batata foram observadas as propriedades há pouco referidas, foi retirada uma alíquota do material cultivado e montado em lâmina-lamínula com prévia adição de lactofenol azul algodão a fim de obtermos a confirmação de tratar-se de colônias de leveduras (MILAN; ZAROR, 2004).



Figura 6 - Isolamento primário de leveduras em ágar-Sabouraud
Fonte: CEMM-2007

2.14.2 Características micromorfológicas das leveduras

A observação das características micromorfológicas, a fim de auxiliar na identificação da espécie da levedura em estudo, foi realizada com o uso da técnica do microcultivo em *Corn-Meal* com *Tween* 80. Esse procedimento se fundamenta no princípio de que a incubação das leveduras em meio com *Tween* 80 e sob baixa tensão de oxigênio estimula a produção de conídios e filamentação, sendo possível sugerir o gênero, ou mesmo a espécie, por meio do estudo da presença e disposição dos blastoconídios, artroconídios, hifas verdadeiras e pseudo-hifas que, por ventura, sejam observados (MILAN; ZAROR, 2004). Entre os possíveis achados da técnica, pode-se mencionar, entre os achados típicos do isolamento de *Candida albicans*, a presença de clamidoconídios esféricos comumente terminais (Figura 7).



Figura 7 - Microcultivo de leveduras em *Corn meal Tween* 80 – Presença de clamidoconídeos de *Candida albicans*

Fonte: Moreira Filho – 2007

2.14.3 Semeadura em CHROMagar-*Candida*

Com o intuito de melhor caracterizar as colônias de leveduras cujas características macromorfológicas e micromorfológicas eram sugestivas do gênero *Candida* sp, assim como, facilitar a identificação de colônias mistas, foram realizadas semeaduras no meio cromogênico CHROMagar *Candida* (Figura 8). Seu princípio é a produção de cor nas colônias pelas reações enzimáticas espécie-específicas, com um substrato cromogênico do meio. Os possíveis resultados da técnica possuem sensibilidade e especificidade que excedem

os 90% para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, que geram, respectivamente, colônias de coloração verde, azul e rosa-pálida (MILAN; ZAROR, 2004).



Figura 8 - CHROMagar: *Candida albicans*
Fonte: CEMM-2007

2.14.4 Exigências nutricionais e fisiológicas

Além dos testes há pouco referidos, o procedimento para identificação das leveduras fez uso, quando necessário para esclarecer as características de algumas cepas coletadas, de provas de natureza funcional e fisiológica tais como: fermentação de carboidratos e assimilação de nitrogênio, descritas na seqüência.

2.14.4.1 Assimilação de nitrogênio

Este teste se caracteriza pela demonstração da habilidade que certas leveduras possuem de crescer aerobicamente na presença de um composto nitrogenado fornecido como única fonte de nitrogênio (MILAN; ZAROR, 2004).

Foi executada a técnica de assimilação de nitrogênio em meio sólido ou técnica auxonográfica, sendo empregado meio ágar destituído de qualquer fonte de nitrogênio, adicionado da suspensão da levedura a ser identificada e distribuído em placa de Petri. Em seguida foram adicionados a peptona (controle positivo) e o nitrato de potássio como fontes de nitrogênio. A positividade foi considerada no caso de crescimento da levedura na presença do composto fornecido.



Figura 9 - Teste de assimilação de nitrogênio
Fonte: CEMM – 2007

2.14.4.2 Fermentação de carboidratos

Conceitua-se o teste da fermentação de carboidratos, em Micologia, como a demonstração da capacidade que algumas leveduras possuem de crescer, em condições de anaerobiose, na presença de certo carboidrato fornecido como única fonte de energia. O teste é considerado positivo em face da produção de gás carbônico e alteração do pH. Foi realizado em meio líquido.

A positividade foi demonstrada por meio da produção de gás (bolha) no interior do tubo de Durham. Foram utilizados os carboidratos dextrose, maltose, sacarose, galactose, trealose e lactose.

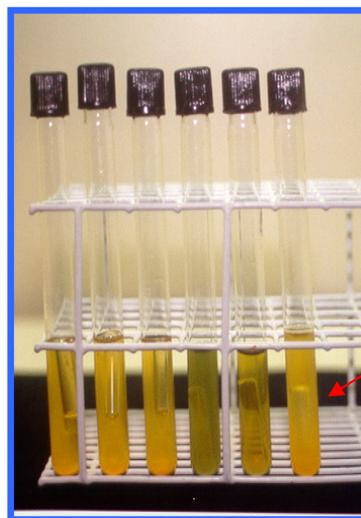


Figura 10 - Fermentação de carboidratos
Fonte: CEMM-2007

2.15 Teste da perfuração do pêlo *in vitro*

Foram organizados três grupos com o intuito de realizar o teste de perfuração de pêlo *in vitro*, divididos da seguinte forma: pêlos do couro cabeludo de doze cadáveres, na faixa etária dos 18 anos a 35 anos; pêlos de couro cabeludo de doze adultos, hígidos, na faixa etária dos 18 anos a 35 anos (controle negativo) e pêlos do couro cabeludo de criança pré-pubere, loira (controle positivo – pela maior celeridade e facilidade de visualização). Os pêlos foram coletados por arrancamento com uso de pinça de dissecação e lâmina de bisturi estéreis. Nenhum dos membros dos grupos possuíam relatos de uso recente de antifúngicos (sistêmicos ou tópicos), tintura ou similares no couro cabeludo. O grupo dos cadáveres adultos foi composto por vítimas de morte violenta, sem relato de infecção clínica motivada por microrganismos fúngicos e se encontravam no período gasoso – entre 3 e 5 dias – do intervalo *post mortem*.

2.15.1 Seleção de cepas de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e de *Trichophyton rubrum*

Foram utilizadas quatro cepas do dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e uma cepa do dermatófito *Trichophyton rubrum*, sem a capacidade de perfuração do pêlo previamente identificadas de acordo com o descrito por Brilhante et al. (2006), pertencentes à micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, Brasil). As cepas estavam estocadas em solução salina a 0,9% a temperatura de 4°C, com as seguintes numerações do *Trichophyton mentagrophytes* (CEMM 03 – 3 - 018, CEMM 1- 4 – 194, CEMM 1 - 5 – 038 e CEMM 1 – 1 – 015) e do *Trichophyton rubrum* (CEMM 01 -1- 116). As características macro e micromorfológicas dos fungos foram analisadas em ágar-batata (Difco, Detroit, USA) e ágar-Sabouraud (Sanofi, France) após 10 dias de incubação a 28°C. As seguintes características foram avaliadas: textura, superfície da colônia e presença de pigmentação. Microcultivo em bloco de ágar-batata foi realizado do mesmo modo adotado por Brilhante et al. (2004).

2.15.2 Execução do teste

Os pêlos do couro cabeludo das três categorias (cadáver, adulto hígido e criança) foram envoltos em papel alumínio e divididos em dois grupos. Um dos grupos foi levado para esterilização com calor úmido por meio de autoclavagem a temperatura de 121° C durante vinte minutos. O segundo grupo não foi submetido a esterilização a fim de observar se haveria interferência no processo de perfuração do pêlo. Em seguida, cada uma das cepas de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* foi testada nas três categorias de pêlos, assim como, a cepa do *Trichophyton rubrum*. Cada cepa foi inoculada em uma placa de Petri pequena (7 mm de diâmetro x 15 mm de altura) contendo ágar-bacteriológico gelosado (Bacto™ Agar, Becton Dickinson Microbiology Systems). Juntamente com a cepa, foram colocados fragmentos dos fios de pêlo do grupo a ser testado. Subsequentemente, as placas foram incubadas a temperatura de 25 a 28 °C. Cada cepa dos dermatófitos foi testada em três amostras do grupo dos adultos hígidos, três amostras do grupo dos cadáveres e em uma amostra de pêlo da criança. Todo o procedimento foi realizado em duplicata gerando um total de 70 placas (30 de adultos hígidos, 30 de cadáveres e 10 de criança pré-púbere). As placas foram, então, avaliadas diariamente por um período de 30 dias. Em cada avaliação, foi retirada uma amostra do pêlo semeado em conjunto com o fungo de cada placa. Fez-se montagem de lâmina e lamínula com acréscimo de lactofenol azul algodão e subsequente análise em microscopia óptica utilizando objetivas com aumento de 10X e 40 X. De acordo com nossos parâmetros, as amostras foram consideradas positivas quando observadas a penetração/perfuração, de pelo menos metade da largura do pêlo analisado e consideradas negativas na ausência da mesma.

2.16 Estoque das amostras

As cepas foram estocadas em tubos de Eppendorf dispersas em solução salina com uso de cloreto de sódio a 0,9% e água destilada.

A posteriori, todos os tubos foram incubados e preservados a temperatura de 4°C.

2.17 Colheita das amostras

No período de 12 meses (janeiro a dezembro de 2007), foram coletadas 400 amostras oriundas de 60 cadáveres em avançado estado de putrefação, sendo 34 do período gasoso, 06 do período coliquativo e 20 do período de esqueletização. As coletas foram realizadas tanto no IML (n=54), como em cemitérios públicos localizados no interior do Ceará (n=6), conforme a distribuição seguinte: Cemitério do Município de Nova Jaguaribara (1) (Figura 11), Cemitério Municipal do Eusébio (2), Cemitério do Bom Jardim – Fortaleza (2) e Cemitério Municipal do Trairi (1).



Figura 11: Perícia médico-legal no Cemitério de Nova Jaguaribara - CE

3 RESULTADOS

3.1 Período Gasoso

3.1.1 Distribuição das amostras por faixa etária, sexo e localidade

Do total de 34 periciados nessa fase de decomposição cadavérica, foi possível a aplicação da ficha epidemiológica em todos os sujeitos, com informes advindos das guias policiais solicitantes da perícia médica-judiciária, assim como pela prestação de informações por familiares e responsáveis ou ainda por meio de ofícios de autoridade judiciárias ou membros do Ministério Público. Verificou-se a seguinte distribuição por sexo: 32 do sexo masculino e somente 02 do sexo feminino. No que se refere à procedência dos periciados, foi observada a seguinte proporção: 14 advindos do interior do estado e 20 oriundos da Capital cearense. No que diz respeito às faixas etárias pesquisadas, foram anotados os valores a seguir: 09 entre 18 e 30 anos, 14 no intervalo de 31 a 40 anos, 02 na faixa dos 41 aos 50 anos e 09 no período de 51 a 60 anos (Tabela 1).

Tabela 1 – Período gasoso: distribuição da amostra por idade, sexo e localidade

FAIXA ETÁRIA (anos)	FORTALEZA		INTERIOR	
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
18-30	04	01	04	00
31-40	10	00	04	00
41-50	01	00	01	00
51-60	03	01	05	00
TOTAL	18	02	14	00

3.1.2 Análise laboratorial das amostras

Do total de 34 cadáveres do período gasoso, foram colhidas 234 amostras para avaliação laboratorial, sendo estas distribuídas em mucosas (n=102), cabelos (n=64), pele (n=34) e pulmão (n=34). Um total de 234 exames diretos revelaram intenso crescimento bacteriano, impossibilitando a visualização de estruturas fúngicas nesta etapa da pesquisa.

Quanto às culturas micológicas, foram observados 99 isolados de fungos filamentosos e 44 isolados de leveduras. Dentre os fungos filamentosos identificados, foi observada a seguinte distribuição, segundo a ordem taxonômica: 84 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=63) e *Penicillium* spp (n=21), 4 da Mucorales - *Mucor* spp (n=4) - 4 da Hypocreales - *Acremonium* spp (n=2), *Trichoderma* sp (n=1), *Fusarium* sp (n=1) - e 2 da Saccharomycetales - *Geotrichum* spp (n=2) .

No referente às leveduras, foi notada a seguinte frequência de isolados conforme a ordem taxonômica: 44 da ordem Saccharomycetales - *Candida* spp (n=44) - e 5 da Tremellales - *Trichosporon* spp (n=5).

3.1.3 Sítios de colheita e fungos isolados

No que concerne à associação quantitativa entre ordens fúngicas e sítios de colheita externos - cabelo e pele – foram encontrados, no período gasoso, os valores a seguir demonstrados. Cabelo: 44 da ordem Eurotiales – *Aspergillus* spp (n=31), *Penicillium* spp (n=11), 10 da ordem Saccharomycetales – *Candida parapsilosis* (n=5), *Candida albicans* (n=4), *Geotrichum* sp (n=1) – 4 da ordem Tremellales - *Trichosporon* spp (n=4), 2 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n= 2) e 1 da ordem Hypocreales - *Acremonium* sp (n=1). Pele: 11 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* sp (n=7) e *Penicillium* spp (n=4), 10 da ordem Saccharomycetales - *Candida albicans* (n=5), *Candida parapsilosis* (n=5) – e 3 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n= 3). (Gráficos 1 e 2).

No que se refere aos sítios internos de colheita – mucosas (oral, genital e retal) e pulmões – foram aferidos os resultados conseguintes. Mucosa: 21 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=16) e *Penicillium* spp (n=5) – 16 da ordem Saccharomycetales - *Candida albicans* (n=10) e *Candida parapsilosis* (n= 6), 2 da ordem Hypocreales - *Acremonium* sp e *Fusarium* sp – 1 da ordem Tremellales - *Trichosporon* sp - e 1 da ordem Mucorales - *Mucor* sp. Pulmões: 10 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=8), *Penicillium* spp (n=2), 5 da

ordem Saccharomycetales - *Candida parapsilosis* (n=3), *Candida albicans* (n=2) - e 1 da ordem Hypocreales (*Trichoderma* sp) (Gráficos 1 e 2).

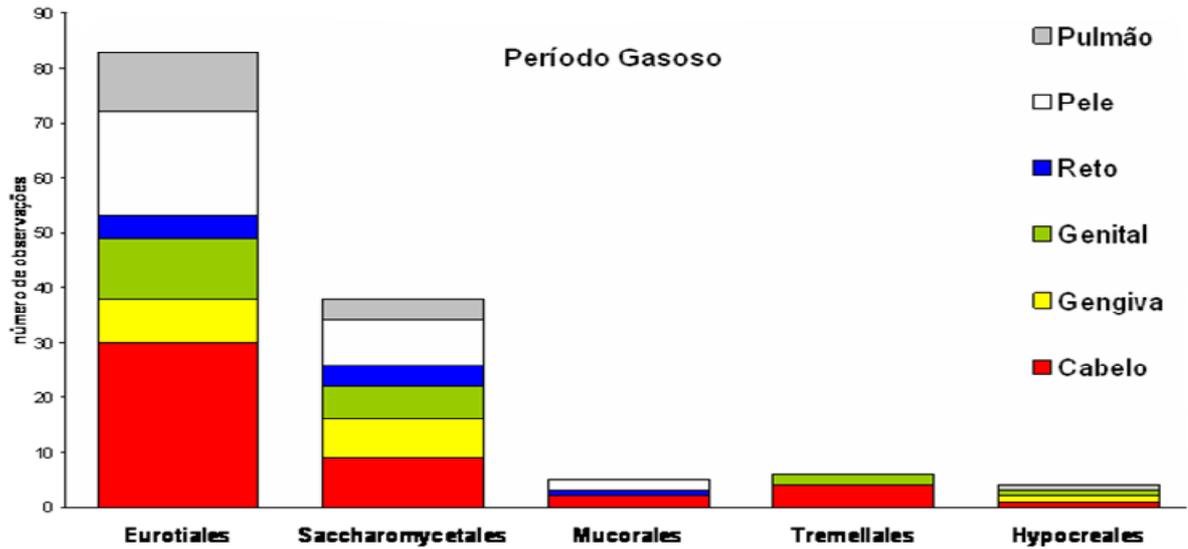


Gráfico 1 - Período Gasoso: sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas

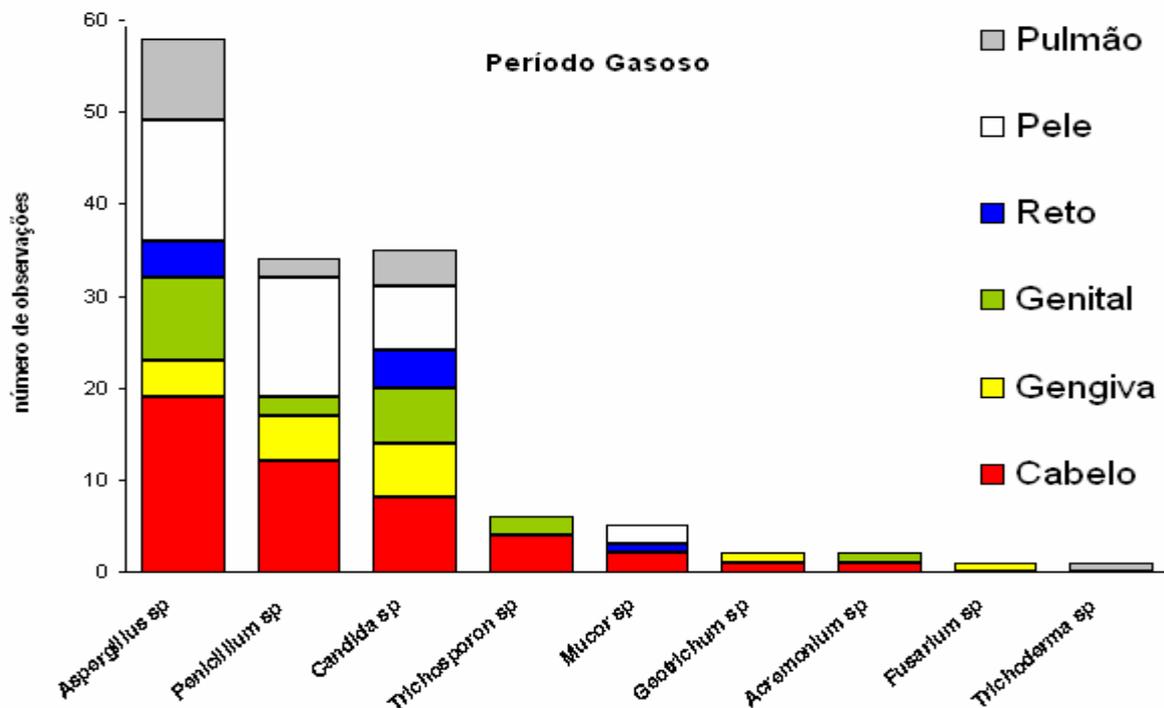


Gráfico 2 - Período gasoso: sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados

3.2 Período Coliquativo

3.2.1 Distribuição das amostras por faixa etária, sexo e localidade

Nesse período da decomposição cadavérica, foi submetido à perícia o montante de 06 corpos com incontinente aplicação da ficha epidemiológica, em todos os periciados, com informações oriundas das autoridades policiais, judiciais ou por órgãos do Ministério Público solicitantes da perícia médico-legal, bem como pela prestação de informações por componentes familiares e responsáveis. Verificou-se a seguinte distribuição por sexo: 04 do sexo masculino e somente 02 do sexo feminino. No que se refere à procedência dos periciados, foi observada a seguinte proporção: 03 advindos do interior do Estado com igual proporção oriunda da capital cearense. No que diz respeito às faixas etárias pesquisadas, foram anotados os valores a seguir: ausência de sujeitos entre 18 e 30 anos, a quase totalidade (05) no intervalo de 31 a 40 anos, somente 01 na faixa dos 41 aos 50 anos e ausência na faixa de 51 a 60 anos (Tabela 2).

Tabela 2 - Período coliquativo: distribuição da amostra por idade, sexo e localidade

FAIXA ETÁRIA (anos)	FORTALEZA		INTERIOR	
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
18-30	00	00	00	00
31-40	02	01	01	01
41-50	00	00	01	00
51-60	00	00	00	00
TOTAL	02	01	02	01

3.2.2 Análise laboratorial das amostras

Foram analisados 42 exames diretos e 126 culturas em placas de Petri contendo ágar-Sabouraud a 2% de glicose [sem antibióticos ou associado com vancomicina (100 mg/ml) e polimixina B (16 mg/l) ou associado com vancomicina, polimixina B e cicloeximida].

O exame direto revelou intenso crescimento bacteriano, o que tornou improfícua, sobretudo, a adequada caracterização e identificação fúngica das lâminas analisadas. No que se refere às culturas, foram observados 16 isolados de fungos filamentosos e 3 isolados de leveduras.

Dentre os fungos filamentosos isolados, registraram-se os seguintes valores quanto à ordem taxonômica: 5 da ordem Eurotiales - *Penicillium* spp (n=2), *Aspergillus* (n=3) – e 1 da ordem Hypocreales - *Acremonium* sp. No referente às leveduras, notou-se a seguinte proporção de isolados: 6 da ordem Saccharomycetales - *Candida* spp (n=6).

3.2.3 Sítios de colheita e fungos isolados

No que se refere à associação quantitativa, no período coliquativo, entre ordens fúngicas e sítios de colheita externos - cabelo e pele – os resultados a seguir foram observados. Cabelo: 3 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* sp (n=2) e *Penicillium* sp (n=1) – e 1 da ordem Hypocreales - *Acremonium* sp. Pele: 1 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* sp e 1 da ordem Saccharomycetales – *Candida albicans* (Gráficos 4 e 5).

No que tange aos sítios internos de colheita – mucosas (oral, genital e retal) e pulmões – foram aferidos os resultados contíguos. Mucosa: 4 da ordem Saccharomycetales – *Candida guilliermondii* (n=2), *Candida albicans* (n=2) – e 1 da ordem Eurotiales - *Penicillium* sp. Pulmões: 1 da ordem Saccharomycetales - *Candida albicans* (Gráficos 3 e 4).

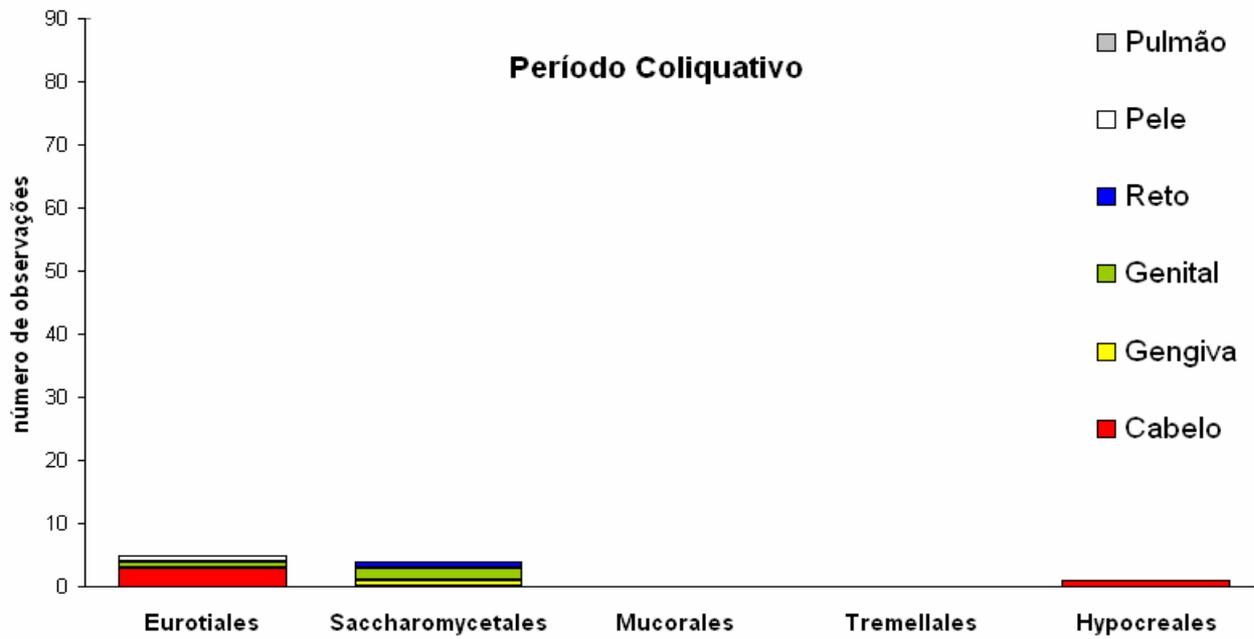


Gráfico 3 - Período Coliquativo: sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas.

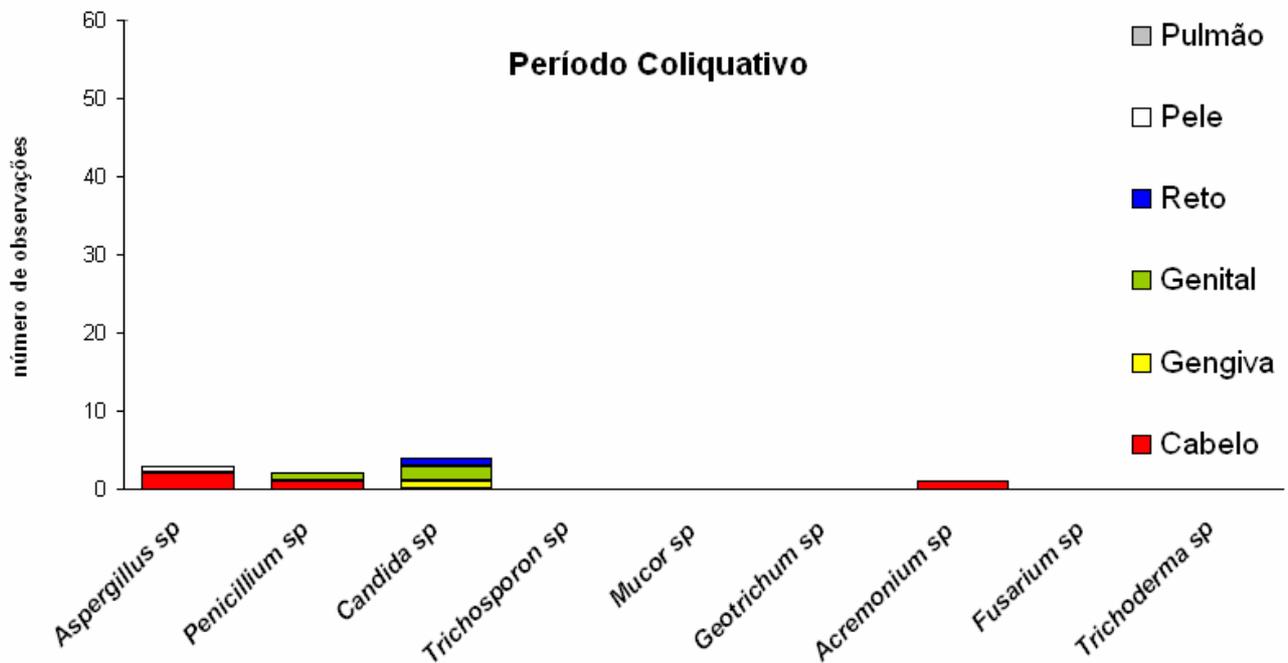


Gráfico 4 - Período coliquativo: sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados

3.3.Período de Esqueletização

3.3.1 Distribuição das amostras por faixa etária, sexo e localidade

Nessa fase da degradação cadavérica foi submetido à perícia o total de 20 corpos com imediata aplicação da ficha epidemiológica, em todos os periciados, com informações originárias das guias policiais solicitantes da perícia médico- legal, da mesma forma que, pela prestação de informações por familiares e responsáveis ou por ofícios de magistrados ou promotores de Justiça. Verificou-se a seguinte distribuição por sexo: 15 do sexo masculino e somente 05 do sexo feminino. No que se refere à procedência dos periciados, foi observada a seguinte proporção: 14 advindos do interior do estado e 06 oriundos da Capital cearense. No que diz respeito às faixas etárias pesquisadas, foram anotados os valores a seguir: 01 sujeito entre 18 e 30 anos, 06 no intervalo de 31 a 40 anos, 08 na faixa dos 41 aos 50 anos e 05 na faixa de 51 a 60 anos (Tabela 3).

Tabela 3 - Período de esqueletização: distribuição da amostra por idade, sexo e localidade

FAIXA ETÁRIA (anos)	FORTALEZA		INTERIOR	
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
18-30	01	00	00	00
31-40	00	00	04	02
41-50	04	00	04	00
51-60	01	00	01	03
TOTAL	06	00	09	05

3.3.2 Análise laboratorial das amostras

Foram analisados 120 exames diretos e semeadas 360 placas de Petri contendo ágar-Sabouraud a 2% de glicose [sem antibiótico ou associado com vancomicina (100 mg/ml) e polimixina B (16 mg/l) ou associado com vancomicina, polimixina B e cicloeximida].

A exemplo dos demais períodos avaliados, o exame direto revelou intenso crescimento bacteriano, o que tornou impossibilitada a adequada caracterização e identificação fúngica das lâminas analisadas. Em alusão às culturas, foram observados 104 isolados de fungos filamentosos e 3 isolados de leveduras.

Dentre os isolados de fungos filamentosos, foram observados os seguintes valores: 40 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=22), *Penicillium* spp (n=18) - 10 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=10) – e 3 da ordem Hypocreales - *Acremonium* spp (n=2), *Trichoderma* sp (n=1). No referente as leveduras, notou-se a seguinte proporção de isolados: 1 da ordem Tremellales (*Trichosporon* sp) e 1 da ordem Saccharomycetales (*Candida* sp).

3.3.3 Sítios de colheita e fungos isolados

No que se refere à associação quantitativa, no período de esqueletização, entre ordens fúngicas e sítios próprios do periciado – cabelo e osso – os seguintes resultados foram observados. Cabelo: 20 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=12) e *Penicillium* spp (n=8) – 4 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=4) – 1 da ordem Hypocreales - *Trichoderma* sp – e 1 da ordem Tremellales - *Trichosporon* sp. Osso: 20 da ordem Eurotiales - *Penicillium* spp (n=11) e *Aspergillus* spp (n=9) - e 3 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=3) (Gráficos 7 e 8).

No que tange aos sítios externos ao periciado – vestes, solo e féretro – foram aferidos os resultados a seguir. Vestes: 22 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=12) e *Penicillium* spp (n=10) – 4 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=4) e 1 da ordem Hypocreales - *Acremonium* sp; Solo: 12 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=7) e *Penicillium* spp (n=5) – 3 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=3) e 1 da ordem Tremellales - *Trichosporon* sp; Féretro: 1 da ordem Saccharomycetales - *Candida* sp (Gráficos 5 e 6).

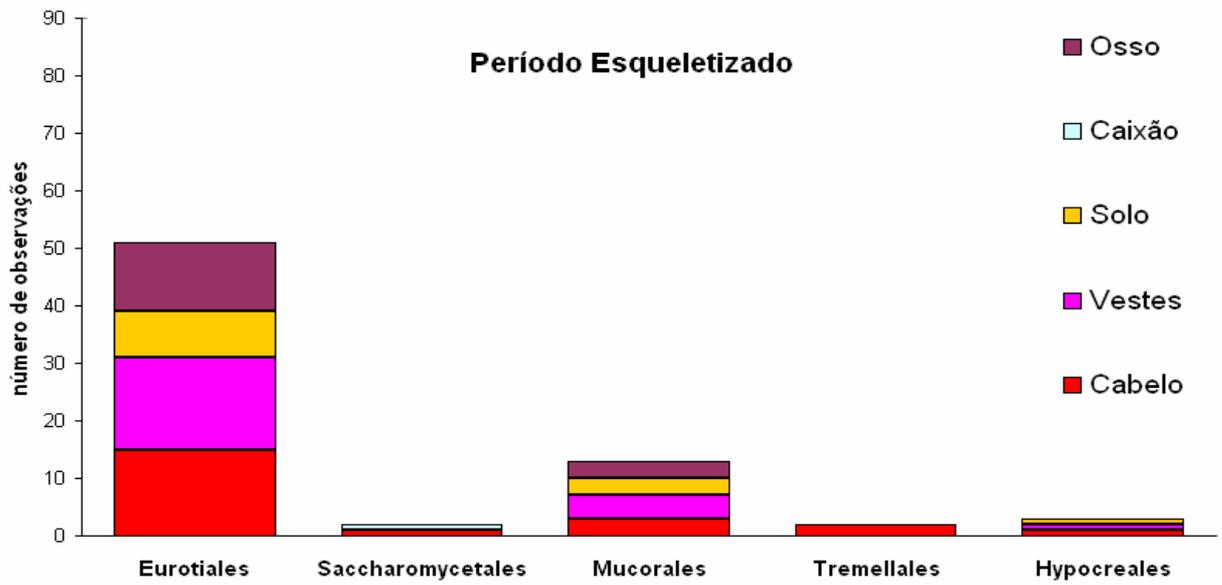


Gráfico 5 - Período de esqueletização: sítios de colheita e ordens fúngicas isoladas

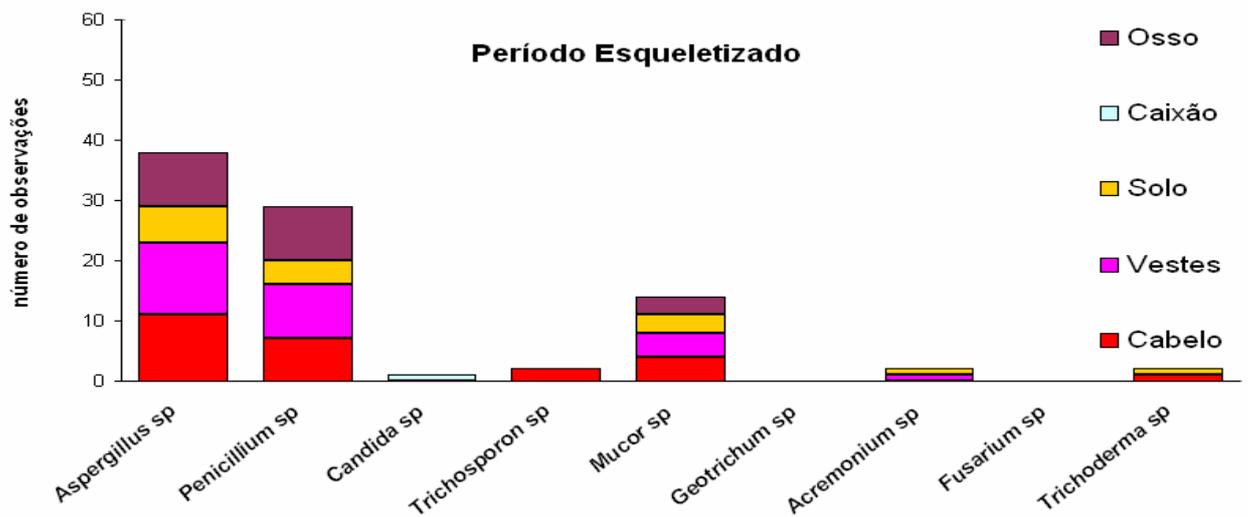


Gráfico 6 - Período esqueletizado: sítios de colheita e gêneros fúngicos isolados

3.4 Causa mortis

No que concerne ao motivo do óbito e sua relação com a ordem fúngica isolada em todos os períodos *post mortem* pesquisados, encontramos a distribuição a seguir exposta. Homicídio: 46 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=25) e *Penicillium* spp (n=21); 8 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=8); 2 da ordem Tremellales – *Trichosporon* spp (n=2); 2 da ordem Hypocreales - *Acremonium* spp (n=2) - e 6 da ordem Saccharomycetales - *Candida* spp (n=5) e *Geotrichum* sp (n= 1). Infortúnio: 49 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=31) e *Penicillium* spp (n=18), 23 da ordem Saccharomycetales - *Candida* spp (n=22) e *Geotrichum* sp (n=1), 3 da ordem Tremellales - *Trichosporon* spp (n=3), 3 da ordem Hypocreales - *Acremonium* spp (n=2), *Fusarium* sp (n=1) - e 4 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=4). Suicídio: 13 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=7) e *Penicillium* spp (n=6) e 7 da ordem Saccharomycetales - *Candida* spp (n=7). Morte de causa indeterminada: 20 da ordem Eurotiales - *Aspergillus* spp (n=16) e *Penicillium* spp (n=4); 10 da ordem Saccharomycetales - *Candida* spp (n=10); 2 da ordem Mucorales - *Mucor* spp (n=2) e 1 da ordem Hypocreales - *Acremonium* spp. (Gráfico 7).

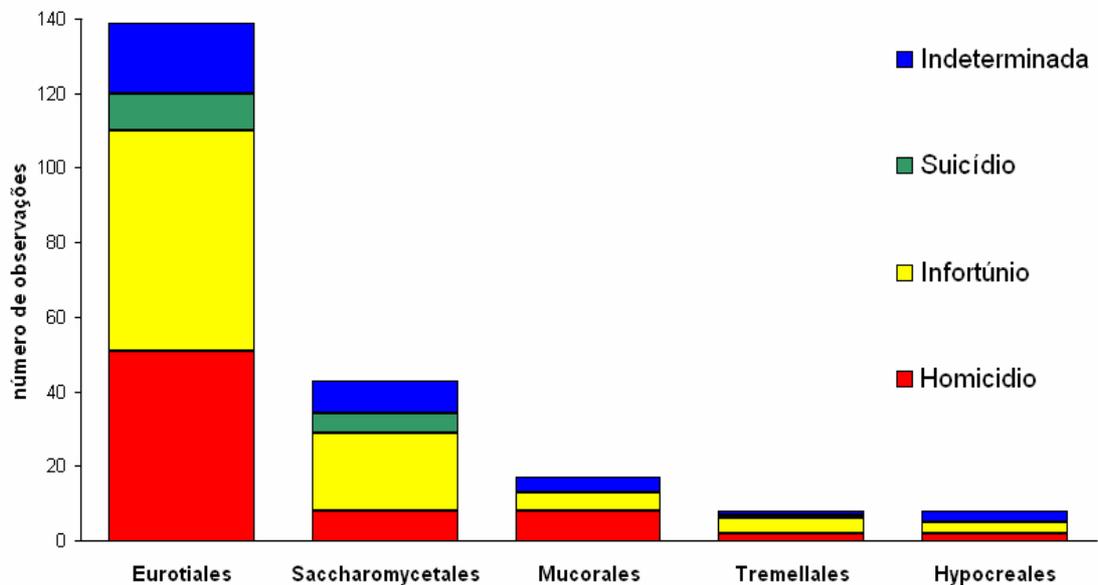


Gráfico 7 - Causa mortis e ordens fúngicas

3.5 Perfuração do pêlo

No que concerne ao teste da perfuração de pêlo, em todas as placas de pêlos dos cadáveres testados (n=12 cadáveres) com *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* foram verificadas perfurações. A positividade do exame ocorreu entre o 13º e o 14º dia de observação (Tabela 4). As características microscópicas da positividade do teste foram evidenciadas como a presença de uma área de perfuração na região medular e/ou no córtex do pêlo penetrando, pelo menos, metade da estrutura do pêlo (Figura 12). No que concerne aos pêlos dos 12 adultos hígidos, utilizados como controle negativo, foram avaliados durante um intervalo de 30 dias e comparados com os achados microscópicos dos pêlos da criança e dos cadáveres, não sendo verificada perfuração de pêlo em nenhuma das amostras observadas, em nenhuma das cepas testadas. A avaliação das placas, em duplicata, demonstraram valores idênticos. Após a observação diária das amostras dos pêlos das crianças pré-púberes, utilizadas como controle positivo, verificou-se a positividade do teste da perfuração de pêlo, em todas as placas testadas, entre o 12 e 14º dia de observação. Não foram observadas alterações dos resultados entre as placas autoclavadas e as não autoclavadas. Em nenhuma das placas testadas com o *Trichophyton rubrum* foi verificada perfuração do pêlo.

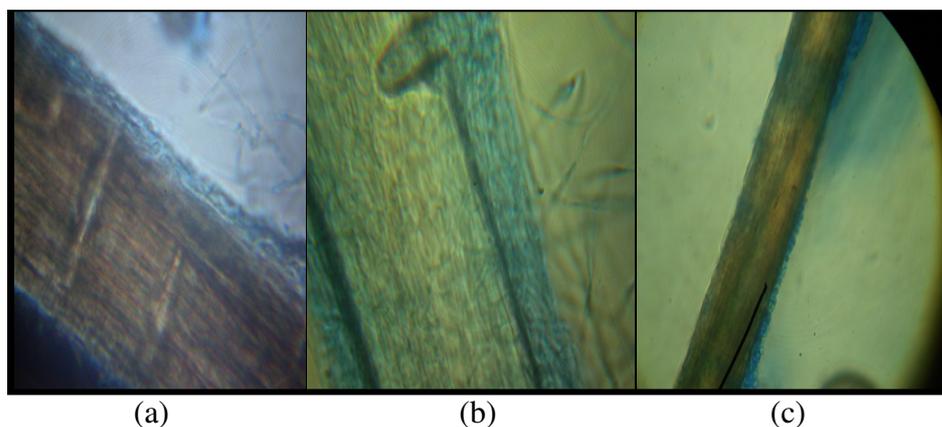


Figura 12 – Microscopia óptica do teste da perfuração do pêlo por *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. (a) Pêlo perfurado do cadáver – Aumento de 40 X; (b) Pêlo perfurado da criança – aumento de 40X; (c) Pêlo não perfurado do adulto hígido – Aumento de 10X

Tabela 4 – Teste da perfuração do pêlo *in vitro* com *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*: pêlo de cadáver, pêlo de criança pré-púbere (controle positivo) e pêlo de adulto hígido (controle negativo)

ORIGEM DO PÊLO	CEPA TESTADA	DIA DA PERFURAÇÃO (+)	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS: LOCAL DA PERFURAÇÃO DO PÊLO
Cadáver			
1	3 - 3 - 018	13°	córtex
2	3 - 3 - 018	14°	córtex
3	3 - 3 - 018	13°	córtex
4	1 - 4 - 194	14°	córtex
5	1 - 4 - 194	14°	medula
6	1 - 4 - 194	13°	córtex
7	1 - 5 - 038	13°	córtex
8	1 - 5 - 038	13°	medula
9	1 - 5 - 038	13°	córtex
10	1 - 1 - 015	14°	córtex
11	1 - 1 - 015	14°	córtex
12	1 - 1 - 015	14°	medula
Criança			
1	3 - 3 - 018	12°	córtex
2	1 - 4 - 194	14°	córtex
3	1 - 5 - 038	13°	medula
4	1 - 1 - 015	14°	córtex
Adulto hígido			
1	3 - 3 - 018	-	-
2	3 - 3 - 018	-	-
3	3 - 3 - 018	-	-
4	1 - 4 - 194	-	-
5	1 - 4 - 194	-	-
6	1 - 4 - 194	-	-
7	1 - 5 - 038	-	-
8	1 - 5 - 038	-	-
9	1 - 5 - 038	-	-
10	1 - 1 - 015	-	-
11	1 - 1 - 015	-	-
12	1 - 1 - 015	-	-

4 DISCUSSÃO

Vários são os fatores que interferem na marcha da morte, e por isso sua cronologia varia de caso para caso. As exumações têm demonstrado o quão diversificados são seus achados. A determinação do tempo da morte é um diagnóstico difícil e, muitas vezes, impossível de obter, exceto por estimativas de intervalo de tempo (ALCÂNTARA, 2006). Será necessário juntar todos os fenômenos de modo a estudá-los quase como uma síndrome – “a síndrome da morte”, cuja análise levaria a um tempo aproximado (FRANÇA, 2008).

Os fenômenos cadavéricos não obedecem ao rigorismo em sua marcha evolutiva, que difere conforme distintos corpos e diferentes *causae mortis*, bem como a influência de fatores extrínsecos (v.g., condições do ambiente, temperatura, umidade ambiental), possibilitando estabelecer o diagnóstico da data da morte tão exatamente quanto possível, porém não com certeza absoluta (CROCE, 2004).

Como é cediço, as determinações do intervalo *post mortem* se fundamentam nos prazos em que se processam os diversos fenômenos transformativos, destrutivos (v.g., autólise, putrefação, maceração) ou conservadores (e.g., saponificação, calcificação, mumificação), que podem ser descritos no cadáver. Desnecessário enfatizar que quanto maior o intervalo de tempo escoado entre o óbito e a perícia médico-legal, maiores serão as dificuldades cronotanatólicas (VANRELL, 2007).

Diversos calendários tanatológicos ou cronotanatólicos têm sido elaborados e pode-se mencionar entre os critérios de comum utilização pericial: esfriamento do cadáver (*algor mortis*), rigidez cadavérica (*rigor mortis*), manchas de hipóstase (*livor mortis*), alterações oculares (v.g., midríase, tela viscosa da córnea, perda da turgência dos globos oculares), conteúdo gástrico, distensão gasosa e fauna cadavérica (GOMES, 2004). Esses dois últimos critérios interessam em particular a este estudo, uma vez que se apresentam como marcadores biológicos *post mortem*, resultantes que são da intensa proliferação bacteriana - com conseqüente produção gasosa - e na sucessão de espécies de insetos que surgem no processo de degradação cadavérica.

Em face do exposto, há que se considerar a possibilidade de aplicação de marcadores biológicos nas perícias judiciais. Tais fatores podem justificar a descrição de diferentes intervalos *post mortem* quando da aplicação do chamado “calendário cronotanatólico” em distintas regiões do planeta (DI MAIO, 1993). A exemplo do que ocorre com os estudos de Entomologia Forense, os fatores externos há pouco elencados

podem determinar a presença de espécies próprias de fungos a determinadas circunstâncias do evento morte, bem como do ambiente no qual se encontra inserido o *de cuius*.

Por tal razão, não é difícil perceber as diferenças entre os escassos relatos disponíveis para o pesquisador em Micologia Forense (ISHII et al., 2006) e os achados descritos em regiões com características peculiares, como o Nordeste brasileiro.

Na presente investigação, que visou indicar os fungos como possíveis marcadores biológicos, alguns pontos-chave foram levantados. O período gasoso da decomposição cadavérica se mostrou como o mais profícuo em termos de número absoluto de perícias realizadas (n=34), bem como no que concerne ao *quantum* de sítios nos quais foram efetivamente isolados espécimes fúngicos (n=6). Em consequência da natural quantidade de substrato orgânico disponível, assim como da ausência dos fatores imunológicos presentes no indivíduo hígido e que dificultam sobremaneira o crescimento fúngico, os microrganismos do grupo encontraram condições favoráveis de divisão. Tal situação é similar aos estados clínicos de imunodeficiência do hospedeiro, como nos usuários de imunodepressores (v.g., corticoesteróides, azatioprina) e nos portadores de neoplasias malignas (e.g., leucemia mielóide aguda) - nos quais não são raros os isolamentos de microrganismos pouco freqüentes na prática clínica (CHABASSE et al., 2005).

O fato dessa fase da decomposição cadavérica albergar o maior número de indivíduos ratifica os dados continuamente tornados disponíveis, por meio de boletins das Secretarias Estaduais da Saúde e da Segurança Pública e Defesa da Cidadania, assim como através da imprensa televisiva e impressa. É dizer, a descoberta de corpos, largados a ermo ou desaparecidos em circunstâncias suspeitas, é maior nas fases iniciais do intervalo *post mortem* quando é mais provável de serem encontrados por populares e/ou membros familiares (FRANÇA, 2008). Isso posto, nossos resultados confirmam ser mais incidente a perícia médico-judiciária nos períodos iniciais pós-morte.

Confrontando com o período coliquativo da evolução tanatológica, percebe-se a relativa redução dos sítios orgânicos, uma vez que a marcha da decomposição cadavérica já evoluiu, via de regra, em meses (FRANÇA, 2008). Tal fato torna ainda mais inóspito o ambiente cadavérico pelo fomento natural da degradação tecidual e competição de microrganismos (e.g., bactérias), animais (v.g., insetos) e fatores naturais (v.g., baixa temperatura).

Embora reduzido o número de perícias realizadas no período coliquativo (n=6), uma vez que se trata de período pouco freqüente entre as descobertas de corpos ou para

execução de exumações, é possível observar-se diferenças quando se confronta com os resultados do período gasoso.

Outro aspecto a se observar é a diferença do *quantum* de sítios de colheita para pesquisa micológica, com redução progressiva, com o avançar do tempo de intervalo *post mortem*. Tal fato ocorre de forma acentuada no período de esqueletização, haja vista a proeminente e avançada degradação cadavérica, contumazmente em anos. Isso posto, constata-se o crescimento fúngico em reduzidos sítios do corpo e em locais do entorno cadavérico, como vestes, fragmentos do féretro e solo. A quantidade de perícias realizadas no período de esqueletização (n=20) denota a relevância do estudo dessa fase tanatológica, uma vez que não são raras as solicitações de avaliações médico-legais em ossadas encontradas a ermo ou de exumações em cemitérios quando da necessidade de esclarecimentos de questões de interesse público no inquérito policial ou ações judiciais.

Ao avaliar os aspectos antropológicos, a pesquisa encontra diferenças consideráveis nos sujeitos da pesquisa. No que tange ao período gasoso, ocorre marcante incidência de indivíduos do sexo masculino (94,11% da distribuição por sexo) corroborando o entendimento de que este gênero apresenta maior aptidão de envolver-se em mortes violentas ou de causas externas. Pode-se compreender tal dado, em conformidade com as informações disponíveis pelo Ministério da Saúde, por intermédio do Sistema de Informações de Mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), pelo comportamento naturalmente impulsivo do sexo masculino, assim como sua tendência de envolver-se em situações de risco, associada com a inobservância do cuidado necessário e concretizada como imprudência (prática de um fato perigoso), negligência (ausência de precaução ou indiferença em relação ao ato realizado) ou imperícia (falta de aptidão para o exercício de certo mister) (CAPEZ; COLNAGO; 2008; JESUS, 2008; MIRABETE; FABBRINI 2007).

Tal conjuntura é comezinha na condução de veículos automotores e violência interpessoal (consumo de entorpecentes, prática de lesões corporais, tentativas de homicídios, dentre outros) normalmente fomentada pelo consumo descomedido de bebidas alcoólicas, que apresenta, como freqüente desenlace, o êxito letal. Os acidentes de trânsito despontam, nas estatísticas epidemiológicas, entre as dez causas mais comuns de óbito no mundo (MURRAY; LOPEZ, 1997). Isso reafirma os dados mais recentes disponíveis em nosso meio: de um total de 5.110 óbitos por causas externas no período de janeiro a dezembro de 2005, no Estado do Ceará, 4.307 foram registrados no sexo masculino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Quando se reporta ao período coliquativo, a distribuição por sexo assume os achados a seguir descritos. Entre os periciados, houve relação dobrada do sexo predominante

(4 foram identificados como sendo do sexo masculino e 2 do sexo feminino) o que ratifica a observação, referida no período gasoso, do maior envolvimento do sexo viril em situações de perícia médico-legal. No que tange ao período de esqueletização, a distribuição por gênero indica o seguinte: ratificam-se os dados epidemiológicos de *causa mortis* em consequência de violência que, notadamente, apontam o sexo masculino como o de mais comum envolvimento em tais ocorrências – com quinze periciados do sexo masculino e cinco do sexo feminino.

Quando se avaliou a procedência do periciado(a) no período gasoso, verificou-se uma predominância de óbitos nos sujeitos advindos da Capital cearense (20 periciados ou 58,82% do total). Ratifica-se, desse modo, a percepção da predominância de causas externas de mortalidade no perímetro de maior concentração urbana – em geral, regiões metropolitanas - quando confrontada com as ocorrências no restante do estado. De acordo com os registros mais recentes do DATASUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), 35,24% dos óbitos de causa violenta, no Ceará, foram registrados em Fortaleza. A concentração urbana, com seu mais rigoroso desequilíbrio econômico e profissional, assim como a impessoalidade das relações sociais e menor apego à religiosidade, tendem a produzir tal contraposição. De mais a mais, o pouco efetivo dos agentes de segurança pública, que devem zelar pela seguridade do cidadão, torna crescente a situação de violência (CÁRDIA; SCHIFFER, 2002). Quando se avalia o período coliquativo quanto à procedência do periciado, ainda que observado não haver predominância do local de origem - mesmo *quantum* (três de cada procedência) dos provenientes da Capital e do interior do Estado – os dados disponíveis não permitem se inferir primazia de uma ou de outra origem.

Ao observar-se os resultados de procedência do período de esqueletização, verificou-se inversão da predominância da origem do periciado, relativamente ao período gasoso. O restante do Estado, salvante a Capital, foi responsável por 70% dos periciados no período, com 14 corpos, contrapondo-se a somente 6 advindos da capital. Tal resultado pode ser explicado pela menor frequência de descobrimento de corpos nessa fase na capital cearense e tendência maior de ocultação cadavérica em locais ermos do Estado e, ainda, maior incidência de sepultamentos em casos de morte violenta ou suspeita sem a prévia perícia médico-legal, o que acarreta, conseqüentemente, maior quantitativo de exumações solicitadas pela autoridade policial ou judiciária com essa motivação.

A distribuição por faixa etária no período gasoso – com mais óbitos anotados entre os 31 e 40 anos (n=14) - denotou resultado divergente dos dados disponíveis pelo Ministério da Saúde (2008). De acordo com esse último, no Estado cearense é maior a incidência de óbitos na faixa dos 20 aos 29 anos, seguida pela faixa etária dos 30 aos 39 anos.

Tal diferença pode ser explicada pela menor expressão de perícias em estados avançados de decomposição na faixa mencionada como mais frequente pelo Ministério da Saúde, uma vez que, via de regra, tais procedimentos, nessa faixa etária, são executados comumente em fases iniciais do óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Tal circunstância se justifica pela ocorrência de mortes violentas nesse grupo etático em circunstâncias nas quais o descobrimento desses indivíduos é facilitado pela presença de testemunhas. No período coliquativo, no que importa a distribuição por faixas etárias, de imediato já se observa ausências de periciados nas faixas extremas - menores de 30 anos e maiores de 51 anos – o que, repetimos, pode ser explicado pela reduzida amostragem do período em análise. Quando se confronta com o período de esqueletização, a distribuição por faixas etárias mostrou: a exceção da faixa etária inicial (entre 18 e 30 anos), que registrou somente 1 caso, não houve uma diferença significativa nos demais intervalos considerados até os 60 anos.

No que concerne aos resultados de isolamento fúngico em todos os períodos avaliados (gasoso, coliquativo e de esqueletização), um dado inicial e também relevante é a infrutífera análise do exame micológico direto. A cinética bacteriana promove mais célere divisão da célula procariótica, quando cotejada com a divisão da célula fúngica, eucariótica. Essa última exige, ainda, condições ajustadas de temperatura, pH, umidade e luminosidade para sua adequada divisão e dinâmica populacional (SIDRIM; ROCHA, 2004; MURRAY et al., 2004). Isso posto, a análise micológica direta, por meio da microscopia óptica, assume valor pífio para o diagnóstico fúngico *post mortem*. Destarte, é imprescindível para os estudos de Micologia Forense a utilização de meios de cultura e/ou métodos laboratoriais complementares com o escopo de identificar os microrganismos fúngicos presentes na avaliação pericial.

Quanto à forma assexuada de divisão fúngica, a forma filamentosa prevaleceu nos períodos gasoso e de esqueletização. Como bem se conhece, essa divisão assexuada é aquela em que a maioria dos fungos se apresenta na natureza (SIDRIM; ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2002), além disso, muitos de seus representantes são anemófilos e de fácil crescimento em praticamente qualquer substrato orgânico (v.g., *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp) (SHARMA, 1988). Em contrapartida, foi observada predominância de leveduras no período coliquativo. Tal resultado pode ser explicado pela menor competição bacteriana e maior exposição dos sítios orgânicos internos (v. g., mucosas) cadavéricos, nesse período. Nos sítios citados, é mais frequente o isolamento de leveduras, por serem partícipes da sua microbiota.

Ao se avaliar os sítios de colheita das amostras para processamento laboratorial, observa-se a nítida prevalência de fungos anemófilos em sítios externos, como o cabelo, e

uma mais comum presença de leveduras em sítios de mucosa, em todos os períodos aferidos. Não obstante, deve-se ter em mente a idéia de que a natural decomposição por que os tecidos sofrem no processo de morte favorece maior comunicação entre sítios externos e internos de colheita, uma vez que barreiras de ordem imunológica, fisiológica e mesmo anatômicas são superadas pela degradação sofrida pelo cadáver (VANRELL, 2007).

Outro ponto de relevância diz respeito à considerável variedade de gêneros no período gasoso da degradação cadavérica. Tal achado pode ser justificado por ser esse o período com maior quantidade de substrato orgânico disponível, tornando-o mais propício à proliferação de microrganismos, embora o número de ordens fúngicas anotadas nas diversas fases do intervalo *post mortem* não tenha variado de forma significativa. A cinética bacteriana, dessa fase, encontra-se em crescimento exponencial - como se percebe claramente pela intensa produção de gases o que inclusive caracteriza e denomina o período (GOMES, 2004).

Quando se atem às ordens fúngicas avaliadas, é indubitável a maior concentração de representantes da ordem Eurotiales, exemplificados pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, nos períodos gasoso e de esqueletização, cujos membros se caracterizam por apresentarem um ascocarpo fechado com os ascósporos dispersos, não aglomerados. Os membros dessa ordem são primariamente saprófitos, mas podem ser, eventualmente, parasitas de plantas, assim como de animais, causando dermatopatias como as chamadas dermatomicoses (ZAMPRONHA et al., 2005). São comuns no solo, madeira, excremento animal, tecidos, plumagem, cornos, cabelos, dentre outros. Tais características prontificam o desenvolvimento de membros dessa ordem nos sítios cadavéricos. Seus membros podem ser termofílicos ou termotolerantes, é dizer, podem crescer em um amplo espectro de temperatura – e.g., *Aspergillus fumigatus* (SILVA; PERALTA, 2000; SHARMA, 1988). Em sua maioria, seus membros são homotáticos, é dizer, autoférteis ou autocompatíveis – capazes de se reproduzirem sexualmente sem o concurso de outro indivíduo, poucos são heterotáticos – em que cada indivíduo é autoestéril ou autoincompatível, capaz de se reproduzir somente com o concurso de outro indivíduo sexualmente compatível. (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, 2008).

Ainda entre os fungos filamentosos, as ordens Mucorales e Hypocreales apresentaram *quantum* semelhante de representantes, no período gasoso. Entre seus gêneros, destaca-se: *Mucor*, *Rhizomucor* e *Rhizopus* (SANTIAGO; MOTTA, 2006). No que tange à primeira ordem, a maioria de seus gêneros é de saprófitas terrestres que vivem em amplo espectro de substrato orgânico incluindo pão, comida cozida, estrume e restos vegetais. Tais

propriedades tornam o ambiente cadavérico propenso ao crescimento de seus representantes. Alguns fungos da ordem Mucorales estão entre os de mais comum isolamento quando da avaliação de solo, água, excrementos orgânicos e vegetais em decomposição. Estes fungos costumam surgir cedo na matéria orgânica em decomposição, desta forma costumam utilizar carboidratos de cadeia simples, muito eficientemente. Por tal motivo, são também chamados de “fungos do açúcar” (SHARMA, 1988).

No que concerne à ordem Hypocreales - que inclui os gêneros *Acremonium*, *Trichoderma* e *Fusarium* - os nichos ecológicos são também ubíquos e podem servir como parasitas de insetos e mesmo de outros fungos (MARSHALL, 2003). Diante do exposto, observa-se que as características de crescimento dos microrganismos fúngicos pertencentes às ordens Mucorales e Hypocreales – entre eles *Mucor* spp e *Acremonium* spp, respectivamente – torna-os potenciais colonizadores da matéria orgânica cadavérica, conforme ratificado neste estudo.

No que se refere à ordem Saccharomycetales – cujo gênero *Candida* é um de seus componentes mais expressivos - seus representantes apresentaram um declínio dos isolados com a evolução do processo de morte e apresenta leveduras unicelulares, uninucleadas que podem eventualmente, durante a sucessão de germinações, gerar um falso micélio, pseudomicélio ou um micélio verdadeiro (SHARMA, 1988). Muitos são saprófitas, embora quadros patogênicos tendo um de seus representantes como agente etiológico não sejam, em absoluto, raros. Entre seus componentes, citamos como espécie de relevante interesse para a prática clínica da Medicina humana - *Candida albicans* (JARVIS, 1995).

Ao se avaliar os gêneros fúngicos encontrados neste estudo, foram constatados, entre os fungos filamentosos, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* como os mais freqüentemente isolados, tanto nos sítios externos de colheita (cabelo e pele), quanto nos sítios internos (mucosas e pulmões) do período gasoso. Corroboram-se, dessa forma, as características próprias desses grupos, uma vez que são fungos anemófilos, ubíquos e de crescimento freqüente em vários substratos, como por exemplo: restos orgânicos, solo (CAVALCANTI et al., 2006), vestimentas, residências e aparelhos de ar-condicionado e, até mesmo, em antissépticos – como no caso do gênero *Aspergillus* (SIDRIM et al., 2004b).

Quando se aferem os achados micológicos do período coliquativo, de pronto, já se observa uma mitigação quantitativa e qualitativa dos fungos isolados. Há destaque, entre os microrganismos filamentosos, para o gênero *Aspergillus* e, entre as leveduras, para o gênero *Candida*. Ressalve-se que nesse período, em particular, há maior representação, em termos

relativos, das leveduras do que dos filamentosos, ao se confrontar com os demais períodos – gasoso e de esqueletização – onde a maior participação dos fungos filamentosos é evidente.

Quando se reportam os resultados do período de esqueletização, nota-se larga predominância de fungos filamentosos no período. Tal resultado se justifica pelas características dos próprios sítios remanescentes (pobres em substratos orgânicos), bem como pelas características de crescimento das espécies isoladas, menos fastidiosas do que as leveduras. É chamativa a predominância indiferente em sítios orgânicos (cabelo e osso) ou inorgânicos (vestes e solo), dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*.

O gênero *Aspergillus*, com 38 isolados nos sítios externos e 24 isolados nos sítios internos, foi o mais comumente observado no período gasoso – tendo-se em conta tanto os fungos filamentosos quanto as leveduras. No período coliquativo, observa-se redução quantitativa desse gênero com somente 2 isolados no cabelo e 1 na pele. De mais a mais, os resultados do período de esqueletização, com 40 isolados do gênero *Aspergillus*, ratificam, uma vez mais, a larga distribuição geográfica desse gênero e seu amplo espectro de nichos ecológicos, em razão de sua propriedade de colonizar uma vasta quantidade de substratos (SIDRIM et al., 2004b). O gênero possui larga variedade de espécies – em torno de 300 – com grande número de contaminantes. Tal diversidade é implicada, ainda, em micoses humanas, especialmente as pulmonares (JÁUREGUI; SULIBARRIA, 2002; DeHOOG et al., 2000). Agentes oportunistas por excelência, podem provocar colonização em cavidades preexistentes - formas ditas saprofíticas. São freqüentemente encontrados em grãos estocados e pêlos. Os conídios são de fácil disseminação e, constantemente, associados com material orgânico (LACAZ et al., 2002). Em razão da ampla variedade de espécies, é importante observar suas características ecológicas corriqueiras – comum isolamento no solo, detritos vegetais, ar atmosférico, alimentos os mais variados, lesões humanas e animais (WILSON et al., 2002). Muitas espécies são termotolerantes e seus conídios hidrofóbicos e secos são de fácil aspiração. Tal achado assume relevância epidemiológica diante dos profissionais – peritos e auxiliares – que manipulam esse material orgânico, uma vez que, na execução da necropsia, a incisão e rebatimento de tecidos é constante (GALVÃO, 2008). Saliente-se, ainda, a possibilidade de competição desse gênero fúngico em sítios de deposição de insetos, como a *Drosophila melanogaster* (ROHLFS, 2008), pois, como já se encontra bem descrito na literatura especializada, esses artrópodes são utilizados como marcadores biológicos (MAGANÃ, 2001).

O segundo gênero, dentre os fungos filamentosos, mais freqüentemente encontrado no período gasoso, foi *Penicillium* spp, com 22 isolados – considerando tanto os

sítios externos quanto os internos. Embora menos comumente do que os demais, representantes do gênero *Penicillium* também foram observados no período coliquativo – dois isolados. Ressalte-se ainda que, com 34 isolados no período de esqueletização, o gênero *Penicillium* confirma seu caráter ubíquo de distribuição na natureza. Este gênero, criado por Link em 1809, apresenta fungos de crescimento rápido e tempo de maturação por volta do terceiro ou quarto dia – compatível com a instalação do período gasoso da decomposição cadavérica (FRANÇA, 2008). É um gênero amplo e ubíquo. Em torno de 200 espécies são distinguíveis, quase todas produtoras de micotoxinas (LACAZ et al., 2002). Muitas espécies são anemófilas onde seus conídios podem alcançar elevadas concentrações atmosféricas na dependência da região demográfica e, por isso, contaminantes cediços de laboratório (SIDRIM et al., 2004c; DeHOOG et al., 2000). Convém ressaltar que estão envolvidos em reciclagem de matéria orgânica ambiental. Registra-se, ainda, o papel das micotoxinas comezinhas na contaminação de alimentos, em especial, em casas de ambiente úmido. Como no gênero *Penicillium* estão incluídas centenas de espécies, necessitam, via de regra, para a correta identificação de determinado microrganismo, profissionais com larga experiência na taxonomia desse grupamento fúngico (SIDRIM et al., 2004c), do mesmo modo que para os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucor*. A maior parte das espécies dificilmente se adapta ao crescimento a 37°C, e são agentes improváveis de doenças sistêmicas, com a principal exceção sendo o complexo do *Penicillium marneffe* (DeHOOG, 2000). Importante é salientar a presença comum de espécies do gênero *Penicillium* em locais de colheita, armazenamento de cereais e clima frio (PITT, 2002), informação essa ratificada pela demonstração de seu crescimento em um ambiente inóspito como a fase coliquativa *post mortem*. Destaque-se, mais uma vez, o caráter ubíquo do gênero pela descrição de espécies de *Penicillium* spp, mesmo em ambientes de gelo subglacial (SONJAK et al., 2006). A comum presença e efetiva atividade metabólica de espécies desse gênero nos mais diversos ambientes pode ser comprovada, também, pela utilização de seus representantes para remoção de certos íons em soluções aquosas (NIU et al., 1993).

O gênero filamentosos *Mucor* foi o terceiro mais freqüentemente isolado nos sítios externos, no período gasoso, com cinco isolados, assim como no período de esqueletização – com sete isolados. Registre-se que o referido gênero não foi observado no período coliquativo. A maior parte das espécies do gênero é referida pelos autores como contaminantes de meios de cultura. Apenas poucos microrganismos, termotolerantes, possuem significado clínico (De HOOG, 2000). Os fungos representantes do gênero são ubíquos e saprófitos isolados do solo, matéria orgânica em decomposição, esterco, detritos

vegetais e frutos macerados (SIDRIM et al., 2004c), o que ratifica os resultados destes experimentos em tal ambiente cadavérico. A maioria das espécies de *Mucor* vive no solo, grãos, flores, fezes de herbívoros e solo afetado por fezes de aves (SCHOENLEIN-CRUSIUS, 2003). Em fezes de herbívoros, há trabalhos que demonstram, inclusive, a sucessão fúngica (ALVES et al., 2002). Os fungos do grupo Mucorales desempenham papel importante nos processos iniciais de reciclagem, sendo responsáveis pela colonização primária do substrato (ALVES et al., 2002). Os esporos assexuados são transportados por correntes de convecção, sendo facilmente disseminados por via aérea e possuindo como principal meio de transmissão a inalação de esporos encontrados no ambiente (LACAZ et al., 2002). Ressalte-se, ainda, que se utilizam dos açúcares de estrutura molecular mais simples (ALVES et al., 2002). Manifestações cerebrais e pulmonares das mucormicoses são atribuídas à inalação de poeira ou água contaminada (CORDEIRO et al., 2004). Tal característica pode ser relevante em avaliações de insalubridade de trabalho dos médicos-legistas e auxiliares de perícia, bem como na indicação de equipamento de proteção individual (EPI) na execução desse mister. Convém lembrar que os zigomicetos – grupo de que este gênero fúngico é representante - encontra-se entre os de comum isolamento em ambientes de solo no Brasil (TAUK-TORNISIELO et al., 2005). Outros gêneros fúngicos tiveram isolamento eventual no período de esqueletização – *Trichoderma*, *Trichosporon*, *Candida* e *Acremonium* – com participação pouco representativa de seus membros.

É oportuno frisar que, apesar da frequência de isolamento dos fungos filamentosos anemófilos há pouco referidos em nos resultados deste trabalho, não se encontra a exata correspondência na descrição de tais achados na literatura especializada. Possivelmente tal fato decorre do tamanho amostral reduzido nos artigos publicados inerentes a Micologia Forense - comumente como descrição de casos. Ishii e colaboradores, no Japão, descreveram a participação de fungos dos gêneros *Eurotium* e *Gliocladium* em dois corpos encontrados no período de esqueletização. O primeiro foi o grupo dominante uma vez que tais fungos são encontrados no solo e exibem propriedades osmofílicas (ISHII et al., 2006). Cabe ressaltar as condições ambientais diversas das encontradas no Nordeste brasileiro. Isso posto, afere-se a necessidade de realização de estudos semelhantes nas diversas regiões, com diferentes condições climáticas, no mundo.

Quando se verificam os isolados das leveduras no período gasoso, tanto no que concerne aos sítios externos quanto internos, o gênero *Candida* se destaca com, respectivamente, 19 e 21 isolamentos. De forma semelhante, entre as leveduras observadas no período coliquativo, o único gênero verificado nesta fase tanatológica foi *Candida* com seis

isolados. De forma oposta, o período de esqueletização demonstrou apenas um isolado do gênero. Como se sabe, muitas espécies de leveduras constituem uma população residente da microbiota de algumas mucosas. Vários estudos foram conduzidos no sentido de determinar a frequência de isolamento de leveduras em indivíduos hígidos e demonstraram percentuais de isolamento que variaram de 2 a 70% em pele, cavidade oral, vagina, jejuno, íleo, cólon e região anorretal (MILAN; ZAROR, 2004). Em face do exposto, pode-se inferir que a microbiota residente das mucosas, uma vez cessadas as funções vitais do indivíduo, inclusive os mecanismos de reparo e defesa imunológica, encontram terreno fértil para sua proliferação *post mortem*. É oportuno lembrar, ainda, que as leveduras apresentam bom crescimento em períodos de 48 horas em meios micológicos e bacterianos comuns como ágar-sangue, ágar-Sabouraud dextrose e ágar de infusão de cérebro e coração (BHI) – tempo suficiente para instalarem-se nas modificações cadavéricas próprias do período gasoso. Existem variações entre as cepas de *Candida* sp em diferentes áreas geográficas, tais variações podem se apresentar como diferenças entre as propriedades fenotípicas como o sorotipo e a resistência a 5-fluorocitosina, dentre outras (ODDS, 1984). O processo de morte, com sua degradação progressiva dos tecidos (VANRELL, 2007), debilita o sistema imunológico e torna o ambiente cadavérico favorável à proliferação de leveduras desse gênero. Além do exposto, convém lembrar que não é recente o conhecimento da relação entre leveduras e moscas do gênero *Drosophila* – sendo as últimas potenciais partícipes da fauna cadavérica (CUNHA et al., 1957). De fato, as leveduras são fontes de nutrientes tanto para a fase de larva quanto para o estágio adulto de várias espécies de insetos. Espécies de *Drosophila* estão intimamente relacionadas com leveduras em ambientes de lodo, além de ter sido verificada a inoculação de leveduras em frutas cítricas (v.g., limões, laranjas) por moscas de frutas. Em sua maioria, as leveduras são rapidamente digeridas pelos insetos após a ingestão, mas algumas células provavelmente sobrevivem o bastante para atravessar o intestino. Outras são transmitidas pela ovoposição (SPENCER; SPENCER, 1997). Também é chamativo o maior crescimento de *Candida* sp na mucosa gengival – o que ratifica sua conhecida presença no trato gastrointestinal (HOSSAIN et al., 2003), já observado em situações tanto de higidez quanto de imunossupressão – além da reduzida quantidade, em termos relativos, do crescimento micótico na região retal. Essa última ocorrência pode relacionar-se com a intensa competição bacteriana e de outros microrganismos neste sítio, já denotada desde o início dos fenômenos cadavéricos com a instalação da mancha verde abdominal (GALVÃO, 2008).

O gênero *Trichosporon*, outra levedura isolada no período gasoso, participa como membro da microbiota da pele e trato intestinal humano e é, também, amplamente distribuído

na natureza (terra, água de lagos e rios, além de animais domésticos)(ROCHA et al., 2004). Dê-se destaque ao fato de que bactérias, insetos e mesmo outros fungos metabolizam substrato de plantas mortas ou em decomposição em formas que podem ser utilizados pelas leveduras. As leveduras não realizam fotossíntese, nem fixam o nitrogênio e dependem de outros organismos para converter seus substratos para formas metabolicamente disponíveis (SPENCER; SPENCER, 1997).

Embora em números absolutos reduzidos, sendo por isso agrupados, cabe destacar o isolamento de outros gêneros fúngicos no período gasoso da degradação cadavérica. Dessa forma, destaca-se: *Geotricum*, *Acremonium* e *Fusarium*. O primeiro gênero é representado por microrganismos componentes da microbiota da pele e trato digestivo de humanos e de algumas espécies animais, sendo relacionados a quadros de infecção oportunistas, principalmente em imunossuprimidos (SIDRIM; ROCHA, 2004). Os resultados aqui relatados demonstram sua presença somente em sítio externo (cabelo), possivelmente advindo da microbiota externa do hospedeiro. No que se refere ao gênero *Acremonium*, membros da família Clavicipitaceae, são conhecidos pela associação com gramíneas, cipós, outros ascomicetos e insetos (CLAY, 2003).

Por fim, o gênero *Fusarium* é composto por fungos comuns como fitopatógenos (com importância econômica) ou como saprófitos de debris de plantas ou do solo, sendo alguns de ocorrência ordinária em sementes e cereais (NELSON et al., 1994). Embora sejam cosmopolitas e freqüentes em solo, plantas, resíduos de plantas ou material orgânico, variações na estrutura e variedade das comunidades fúngicas podem estar associadas com mudanças climáticas específicas nas demais regiões da Terra (VUJANOVIC et al., 2006). Essa última característica pode explicar uma possível variação de achados, em isolados de estudos de Micologia Forense, em regiões diferentes do mundo.

Ressalve-se que, até o presente estudo, os microrganismos fúngicos citados não possuíam relatos de isolamento nas condições de putrefação cadavérica ou possuíam apenas em reduzida quantidade (ISHII, 2007; ISHII et al., 2006), via de regra, pela não colheita de material e investigação destes nas condições referidas. Com os resultados aqui demonstrados, embora ainda que de forma descritiva, manifesta-se a presença de tais fungos em condições inóspitas que, além da possibilidade de marcação cronotanatólogica de interesse de Medicina Legal, aventa-se a possibilidade de atuarem como agentes patogênicos para os profissionais que executam suas atividades laboral-periciais em contato com eles, tais como: médicos legistas, auxiliares de necropsia e empregados de cemitérios públicos ou privados.

Conforme a subdivisão feita entre sítios para colheita, observou-se que os externos se mostraram como propícios ao crescimento fúngico, tanto da forma filamentosa quanto de leveduras, o que corrobora trabalhos demonstrativos das alterações promovidas por fungos no *post mortem* (COLLIER, 2005). Entretanto, as leveduras mostraram ligeiro maior crescimento na pele do que na região capilar, com dez isolados cutâneos contra nove no cabelo. Tal fato pode ser explicado pelo rompimento pós-morte das barreiras dérmicas e maior contato com secreções mucosas, além de sua eventual presença na microbiota da pele (MILAN; ZAROR, 2004).

No período de esqueletização, a divisão entre sítios orgânicos e sítios externos ao corpo permitiu avaliar possíveis diferenças de crescimento, uma vez que, nessa fase, todos os substratos para crescimento fúngico se encontram reduzidos e quase que em um *continuum* - expostos a condições semelhantes do ambiente. Os sítios próprios do periciado (orgânicos) - cabelo e tecido ósseo - demonstraram um crescimento fúngico de pouca variação quantitativa e qualitativa. Tal achado vai ao encontro de descrições de artigos internacionais das semelhanças dos fungos isolados nessas condições (HITOSUGI et al., 2006).

Quando se faz referência aos sítios externos ao corpo (inorgânicos) do esqueletizado - vestes, solo e fêretro - também não foram encontradas diferenças relevantes no isolamento. Tal achado sugere, uma vez mais, que os microrganismos capazes de crescimento em tais sítios possuem características próprias e pouca variação de gêneros aptos a se desenvolverem nessas condições de crescimento.

Ao se referir à relação com a *causa mortis* nas perícias realizadas no período gasoso, não se verificam diferenças significativas entre o motivo do óbito e o gênero fúngico isolado. Apesar da variação de fatores externos responsáveis pela determinação do óbito - homicídio (v.g., armas de fogo, armas brancas), infortúnio (e.g., queimaduras, politraumatismos, descargas elétricas, acidentes de trânsito), suicídio (v.g., enforcamentos, envenenamentos, armas de fogo) ou indeterminada - não se observou uma incidência estatisticamente significativa entre o crescimento de gêneros fúngicos para determinada *causa mortis*. Tal fato conduz a acreditar que este fator não influencia o crescimento desses microrganismos.

O aspecto *causa mortis* não foi negligenciado na avaliação do período coliquativo, a despeito do reduzido *quantum* periciado. É mister reconhecer, entretanto, que - a exemplo da avaliação dos sítios de colheita - a discussão das informações aferidas fica restrita ao campo da descrição e exposição dos resultados, haja vista não ser possível discussão e conseqüente conclusão mais ampla em face da pequena monta analisada.

Por fim, a análise dos resultados não fornece dados que indiquem relação entre a causa do óbito e um grupo micológico próprio desta no período de esqueletização – no caso das mortes relacionadas aos suicídios (comuns, como enforcamento ou com uso de armas de fogo) não houve isolamento de qualquer fungo. Tal verificação aponta no sentido de inexistência de relação entre as duas variáveis (fungos e *causa mortis*) em qualquer dos períodos avaliados.

No que concerne ao experimento realizado com o teste da perfuração do pêlo *in vitro* – teste inicialmente descrito por George e Ajello (BAHUGUNA; KUSHWAHA, 1989; SALKIN et al., 1985) e que se fundamenta na capacidade do *Trichophyton mentagrophytes* perfurar o pêlo e na incapacidade do *Trichophyton rubrum* de fazê-lo - o teste padrão é eficaz e de simples realização, embora consuma um período considerável para sua execução - de uma a quatro semanas (SINSKI et al., 1981).

É sabido que todas as barreiras de defesa do organismo humano são rompidas com o cessamento das funções vitais, ocorrendo, então, a morte das estruturas com o incontinente óbito do indivíduo (DI MAIO, 1993). Uma vez iniciados, os diversos fenômenos da degradação cadavérica ocorrem em um *continuum*. Além da influência hormonal ao longo da vida, a conformação do pêlo também é objeto de alterações no período *post mortem* (COLLIER, 2005). A cutícula, que *in vitam* funciona como verdadeira barreira de proteção do pêlo, é alvo de rápida degeneração ao longo da decomposição cadavérica, permitindo, dessa forma, degradação e mais intenso crescimento de microrganismos, como bactérias e fungos. Ainda é limitada, na literatura médica, a descrição da interação de microrganismos fúngicos com o hospedeiro humano no período *post mortem* (CARTER; TIBBETT, 2003). Nesse momento, com o natural processo de decomposição, tornam-se facilitadas a proliferação de microrganismos e a atuação de fatores de patogenicidade, como as hemolisinas (SCHAUFUSS; STELLER, 2003). Com suporte no há pouco referido, e conhecendo a propriedade da enzima perfuradora de pêlo do *Trichophyton mentagrophytes*, pode ser justificada a observação da perfuração em pêlos de cadáver infectados com esse fungo.

Observando a proliferação do fungo, bem como a efetiva atuação das enzimas perfuradoras de pêlo do *Trichophyton mentagrophytes* em pêlos do couro cabeludo de cadáveres de indivíduos adultos no período gasoso *post mortem*, constata-se que, nessa fase do processo de decomposição cadavérica, a degradação natural *post mortem* não interfere com a propriedade do microrganismo perfurá-lo sem o destruir; pelo contrário, o pêlo degradado parece ter facilitado sua perfuração, haja vista as diferenças encontradas quando comparadas com o grupo-controle dos adultos vivos e hígidos. Estes resultados são pioneiros, uma vez

que não se registra na literatura especializada essa vertente de pesquisa de marcadores biológicos com o escopo de determinar o intervalo *post mortem*.

Outro aspecto a ser observado, quanto ao isolamento fúngico *post mortem*, diz respeito à ausência de fungos demáceos (com capacidade de produzir pigmento, geralmente melanina) entre os isolados da pesquisa. Aventa-se a idéia de que tal fato pode se haver dado em razão das características de crescimento comum a vários representantes do grupo que, de ordinário, crescem lentamente, produzindo lesões de evolução crônica (SIDRIM; ROCHA, 2004). De mais a mais, a intensa competição com bactérias, fungos e mesmo insetos pode ter concorrido para seu não-isolamento nos achados desta pesquisa. Isso posto, demonstra-se a existência de fungos com características próprias, capazes de ocupar tais sítios, é dizer, que se encontram adaptados – com vias metabólicas diferenciadas – capazes de proliferar no ambiente cadavérico.

A interação fungo - hospedeiro cadáver e a Micologia Forense ensejam um vasto campo de pesquisa a ser trilhado a fim de melhor compreender as possíveis aplicações do entendimento desse contato recíproco. Como exemplo, cita-se: o auxílio à determinação do intervalo *post mortem* (associado aos parâmetros comumente utilizados em Medicina Legal), a descrição de espécies fúngicas próprias do processo de decomposição cadavérica e o auxílio à compreensão de aspectos ecológicos e fisiológicos dos fungos presentes na degradação do cadáver. Estes resultados contribuem nesse entendimento. Qualquer dos referidos parâmetros devem, ordinariamente, ser analisados em conjunto, entre si e com fatores externos, de modo que possibilitem maior fidedignidade nos laudos técnicos que acompanham as perícias médico-judiciárias (HENßGE; MADEA, 2004).

Convém lembrar, ainda, que não é recente a observação, por médicos-legistas, da presença de fungos na superfície de cadáveres humanos. O isolamento desses microrganismos, entretanto, não tem sido feito. Uma vez que sua descrição pode caracterizar inclusive o ambiente onde ocorreu a morte, são necessários estudos suplementares para seu uso como instrumento forense (ISHII et al., 2006).

Finalmente, o presente trabalho não possuiu a pretensão de esgotar o tema que aborda. Ele ainda não indica um marcador biológico efetivo que permita, com segurança, demonstrar a relação fungo-intervalo *post mortem*. Ele demonstra, no entanto, que existem diferenças entre os isolados fúngicos ao longo da degradação cadavérica. O período gasoso se caracterizou pelo crescimento de fungos filamentosos e de leveduras em um *quantum* considerável de cada grupo. O período coliquativo, em termos relativos, tendeu a mitigar o crescimento fúngico, com destaque pela presença, mais significativa, das leveduras. No que

concerne ao período de esqueletização, os fungos filamentosos preponderaram – quando comparados com as leveduras. Tais resultados podem nortear o médico-legista, em associação com os demais critérios cronotanatológicos, na determinação, o mais preciso quanto possível, na determinação do lapso transcorrido entre o cessamento das funções vitais e a perícia médico-judiciária.

Isso posto, a descrição de seus achados já permite traçar um horizonte que possa servir como ponto de apoio e aprofundamento da matéria. Mais pesquisas devem ser executadas a fim de fortalecer essa divisão da Ciência Micológica com o escopo de que, em futuro breve, seja possível a utilização freqüente de tais achados às perícias médico-judiciárias - a exemplo do que já ocorre com os achados da Entomologia Forense, com suas condições e técnicas próprias de isolamento.

5 CONCLUSÕES

Na presente pesquisa, demonstra-se:

- O período gasoso *post mortem* apresentou isolados de fungos filamentosos e de leveduras, apresentando os gêneros *Aspergillus* e *Candida* como, respectivamente, os mais freqüentes;
- O período coliquativo apresentou isolados de *Candida* sp (cerca de metade dos isolamentos no período), verificando-se maior freqüência relativa de leveduras que os demais intervalos *post mortem*;
- O período de esqueletização demonstrou uma predominância dos fungos filamentosos anemófilos com os isolados de *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Mucor* spp;
- O teste da perfuração do pêlo *in vitro*, com a presença do *Trichophyton mentagrophytes*, é passível de ser aplicado *post mortem*.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, A. M. Tanatología, exhumaciones y estudio de osamentas. **Revista Ius et Praxis**, Chile, v. 7, n. 1, p. 101-116, 1996.

ALCÂNTARA, H. R. **Perícia médica judicial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

ALVES, M. H.; TRUFEM, S. F. B.; MILANEZ, A. I. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros. **Revista Brasileira de Botânica**, Recife, v.25, n. 2, p. 147-160, 2002.

BAHUGUNA, S.; KUSHWAHA, R. K. S. Hair perforation by keratinophilic fungi. **Mycoses**, Alemanha, v. 32, n. 7, p. 340-343, 1989.

BRASIL. **Código Civil e Constituição Federal**: tradicional. 59. ed. São Paulo: Saraiva, 2008.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, A. J., MEIRELES, T. E. F.; SIDRIM, J. J. C. Tinea capitis in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: the role of *Trichophyton tonsurans*. **International Journal of Dermatology**, Estados Unidos, v. 43, n. 8, p. 575-579, 2004.

BRUNICARDI, F. C.; ANDERSON, D. K.; BRANDT, M. L. **Schwartz's principles of surgery self-assessment and board review**. New York: McGraw- Hill, 2006.

BURTON, J. L. Health and safety at necropsy. **Journal of Clinical Pathology**, United Kingdom, v. 56, p. 254-260, 2003.

CAMPOS, M. C.; MENDONZA, C.; MOURA, G.; MELO, R. B. **Compêndio de Medicina Legal Aplicada**. Recife: EDUPE, 2000.

CAPEZ, F.; COLNAGO, R. **Direito Penal**: parte geral. São Paulo: Saraiva, 2008.

CARDIA, N.; SCHIFFER, S. Violência e desigualdade social. **Revista Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 3, p. 25-31, 2002.

CARTER, D. O.; TIBBETT, M. Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. **Journal of Forensic Sciences**, United States, v. 48, n.1, p. 168-171, 2003.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. C.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CHABASSE, D.; PIHET, M.; BOUCHARA, J. P. Les moisissures opportunistes: émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine revue générale. **Revue Française des Laboratoires**, France, 2005, n. 373, p. 21-34, 2005.

CLAY, K. The ecology and evolution of endophytes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Estados Unidos, v. 44, n. 1-4, p. 39-64, 1993.

COLLIER, J. H. **Estimating the postmortem interval in forensic cases through the analysis of postmortem deterioration of human head hair**. 2005. 38f. Dissertação (Master of Arts). Louisiana State University, 2005.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C. Zigomicose e hialohifomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004. p. 166-176.

CROCE, D. **Manual de Medicina Legal**. São Paulo: Editora Saraiva, 2004.

CUNHA, A. B.; SHEHATA, A. M. E.; OLIVEIRA, W. A Study of the diets and nutritional preferences of tropical species of drosophila. **Ecology**, Estados Unidos, v. 38, n. 1, p. 98-106, 1957.

DeGAETANO, D. H.; KEMPTON, J. B.; ROWE, W. F. Fungal Tunneling of Hair from a Buried Body. **Journal of Forensic Sciences**, United States, v. 37, n. 4, p. 1048-1054, 1992.

DE HOOG G. S.; GUARRO, J.; GENE, J; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Espanha: CentralBureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and the Rovira i Virgili University, 2000.

DI MAIO, D. J.; DI MAIO, V. J. **Forensic pathology**. Boca Ratón: CRC Press Inc., 1993.

DOUGLAS, W.; CALHAU, L. B.; KRYMCHANTOWSKY, A. V.; DUQUE, F. G. **Medicina Legal: teoria, jurisprudência e questões**. Rio de Janeiro: Impetus, 2003.

ELLIOTT, S.; LOWE, P.; SYMONDS, A. The possible influence of micro-organisms and putrefaction in the production of GHB in post-mortem biological fluid. **Forensic International Science**, United States, v. 139, n. 2-3, p. 177-181, 2004.

ENTORNOMÉDICO. **Flora y fauna cadaverica**. México: Medicina Forense, 2008. Disponível em: <<http://www.entornomedico.org/medicos/tanatologiaem/tanatologia/forense-3-5.html>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

FRANÇA, G. V. **Medicina Legal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2008.

GAIOTTO, P. C. **Contribuição ao estudo da estimativa do tempo decorrido de morte por meio da dosagem de íons “Mg++”, “K+”, “Na+”, “Ca”, “P” e eletrólito “U” no humor vítreo de coelhos**. 2003. 97f. Tese (Doutorado em Radiologia Odontológica) - Universidade Estadual de Campinas/Piracicaba, 2003.

GALVÃO, L. C. **Medicina Legal**. São Paulo: Editora Santos, 2008.

GOMES, H. **Medicina Legal**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2004.

HACKETT, C. J. Microscopical focal destruction (Tunnels) in exhumed human bones. **Medical Science Law**, Great Britain, v. 21, n. 4, p. 243-265, 1981.

HENßGE, C.; MADEA, B. Estimation of the time since death in the early *post mortem* period. **Forensic Science International**, Ireland, v. 144, p. 167-175, 2004.

HITOSUGI, M.; ISHII, K.; YAGUCHI, T.; CHIGUSA, Y.; KUROSU, A.; KIDO, M.; NAGAI, T.; TOKUDOME, S. Fungi can be a useful forensic tool. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 8, n° 4, p. 240-242, 2006.

HOSSAIN, H.; ANSARI, F.; SCHULZ-WEIDNER, N.; W.-E. WETZEL, W.-E.; T. CHAKRABORTY, T., DOMANN, E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiology and Immunology**, Estados Unidos, v. 18, n. 5, p. 302-308, 2003.

ISHII, K.; HITOSUGI, M.; YAGUCHI, T.; TOKUDOME, S. The importance of forensic mycology. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 9, p.287, 2007.

ISHII, K. Analysis of fungi detected in human cadavers. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 8, p. 188-190, 2006.

JACKOWSKI, C.; DIRNHOFER, S.; THALI, M.; AGHAYEV, E.; DIRNHOFER, R.; SONNENSCHNEIN, M. Postmortem diagnostics using MSCT and MRI of a lethal streptococcus group. A infection at infancy: a case report. **Forensic Science International**, Ireland, v.151, n. 2-3, p.157-63, 2005.

JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, United States, v. 20, n. 6, p.1526-1530, 1995.

JÁUREGUI, J. M. S.; SULIBARRIA, Z. Z. Las micosis en los pacientes infectados por el VIH en la era de los tratamientos antirretrovirales de gran eficacia. **Revista Iberoamericana de Micología**, Espanha, v. 19, p. 5-8, 2002.

JESUS, D. E. **Direito Penal**: parte geral. v. 1. São Paulo: Saraiva, 2008.

KROMPECHER, T. Experimental evaluation of rigor mortis. **Forensic Science international**, Ireland, v. 68, n. 3, p. 149-159, 1994.

KRYMCHANTOWSKI, A.; DUQUE, F. G.; CALHAU, L. B.; XAVIER, L. M.; ANCILLOTTI, R.; DOUGLAS, W. **Medicina Legal**: teoria e prática à luz do Direito Penal e Processual Penal. Rio de Janeiro: Impetus, 2006.

LACAZ, C. S. História da Micologia Médica no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 58, n. 6, p. 265-270, 1983.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LESTER W. BURKET D.D.S. Post-mortem bacteriologic studies of different areas of human teeth and their supporting structure. An attempt to trace the possible path by which bacteria reach the periapical region of intact teeth. **Journal of Dental Research**, United States, v. 21, n. 1, p. 9-17, 1942.

LUCCI, A.; CIRNELLI, A. A microbiological test for the diagnosis of death by drowning. **Forensic Science International**, Ireland, v. 168, n. 1, p. 34-36, 2007.

MAGAÑA, C. La Entomología Forense y su aplicación a la Medicina Legal: data de la muerte. **Aracnet 7 - Bol. S.E.A.**, Espanha, n. 28, p. 49-57, 2001.

MARSHALL, N. L. **Mushroom book: a Popular Guide to the Identification and Study of Our Commoner Fungi, with Special Emphasis on the Edible Varieties.** United States: Kessinger Publishing, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informações de Mortalidade.** Brasil: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em <[http:// www.tabnet.datasus.gov.br](http://www.tabnet.datasus.gov.br)>. Acesso em: 10 jun. 2008.

MENEZES, R. G. ; JAIN, A. ; KANCHAN, T. ; MONTEIRO, F. N. P. ; MANIPADY, S. ; RAO, P. P. J. Forensic mycology. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 9, n. 48, 2007.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J. J.C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004. p. 89-101.

MIRABETE, J. F.; FABBRINI, R. N. **Manual de Direito Penal: parte geral.** v. 1. São Paulo: Atlas, 2007.

MITCHELL, T. G. Micologia Médica. In: BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick e Adelberg: Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill, 2005. p. 491-518.

MORRIS, J. A.; HARRISON, L. M.; PARTRIDGE, S. M. Postmortem bacteriology: a re-evaluation. **Journal of Clinical Pathology**, United Kingdom, v. 59, p. 1-9, 2006.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: global Burden of Disease Study. **Lancet**, United Kingdom, v. 349, n. 9061, p. 1269-1276, 1997.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAÏSSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 7, n. 4, p. 479-504, 1994.

NIU, H.; XU, S.; WANG, J.H.; VOLESKY, B. Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. **AGRIS record**, Estados Unidos, v. 42, n.6, p. 785-787, 1993.

ODDS, F. C. Ecology and epidemiology of *Candida* species. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]**, Alemanha, v. 257, n. 2, p. 207-212, 1984.

OLIVEIRA, R. N.; SILVA, S. F. S.; UCHÔA, D. P.; MESQUITA, R. A.; NUNES, F. D. Presença de fungos na dentina humana: implicações arqueológicas e forenses. **Ciência Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 87-90, 2004.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**, United States, v. 155, p. 507-513, 2004.

PITT, J.I. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Estados Unidos, v. 504, p. 29-41, 2002.

PUJOL-LUZ, J. R.; MARQUES, H.; URURAHY-RODRIGUES, A.; RAFAEL, J. A. ; SANTANA, F. H. A.; ARANTES, L. C.; CONSTANTINO, R. A forensic entomology case from the Amazon Rain Forest of Brazil. **Journal of Forensic Science**, United States, v. 51, n. 5, p. 1151-1153, 2006.

ROBERTSON, M. D.; DRUMMER, O. H. Postmortem drug metabolism by bacteria. **Journal of Forensic Science**, United States, v. 40, n.3, p. 382-386, 1995.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; DIÓGENES, M. J. N. Piedras. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004. p. 129-134.

ROHLFS, M. Host-parasitoid interaction as affected by interkingdom competition. **Oecologia**, Alemanha, v. 155, n. 1, p. 161-168, 2008.

SALKIN, I. F.; HOLLICK, G. E.; HURD, N. J.; KEMNA, M. E. Evaluation of Human Hair Sources for the In Vitro Hair Perforation Test. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v. 22, n. 6, p. 1048-1049, 1985.

SANDÍ, G. F. Investigación medico legal en la scena de la muerte. **Medicina Legal de Costa Rica**, Costa Rica, v. 15, n. 1-2, p. 35-43, 1998.

SANTIAGO, A. L. C. A.; MOTTA C. M. S. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 20, n.3, p. 641-647, 2006.

SCHAUFUSS, P.; STELLER, U. Haemolytic activities of Trichophyton species. **Medical mycology**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 511-516, 2003.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. Sucessão fúngica em folhas de *Alchornea triplinervia* (Spreng.) M. Arg. em ambientes aquático e terrestre, na Mata Atlântica, Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. 1993. 373f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

SHARMA, O. P. **Textbook of Fungi**. United States: McGraw-Hill, 1988.

SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004.

SIDRIM, J. J. C. Do despertar da micologia médica até o século XXI. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004. p. 19-27.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Colheita, isolamento primário e laudos laboratoriais. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004a. p. 63-82.

SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G. Aspergilose e Fusariose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004b. p. 275-282.

SIDRIM, J. J. C.; PAIXÃO, G. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Principais fungos contaminantes em rotina de micologia médica. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004c. p. 318-326.

SILVA, W. B.; PERALTA, R. M. Caracterização bioquímica de uma enzima extra-celular de um fungo termo-tolerante. **Biological and Health Sciences**, Paraná, v. 6, n. 1, p. 7-19, 2000.

SINSKI, J. T.; AVERMAETE, D. V.; KELLEY, L. M. Analysis of Tests Used to Differentiate *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos, v. 13, n. 1, p. 62-65, 1981.

SONJAK, S., FRISVAD, J.C.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium*: mycobiota in Arctic Subglacial Ice. **Microbial Ecology**, Estados Unidos, v. 52, p. 207–216, 2006.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. M. **Yeasts in natural and artificial habitats: their Lives in Natural and Artificial Habitats**. United States : Springer, 1997.

SUASSUNA, I. R. Microbiologia médica: começo e caminhos. In: SIDRIM, J. J.C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2004. p. 1-18.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATTILI, D. S.; MALAGUTTI, E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, Estados Unidos, v. 45, n. 1, p. 72-82, 2005.

TSOKOS, M.; REICHEL, U.; NIERHAUS, A.; PÜSCHEL, K. Serum procalcitonin (PCT): a valuable biochemical parameter for the post-mortem diagnosis of sepsis. **International Journal of Legal Medicine**, Alemanha, v.114, n. 4-5, p. 1437-1596, 2001.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA. Eumycota ou fungos verdadeiros. Bahia: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008. Disponível em <<http://www.uefs.br>>. Acesso em: 23 jun. 2008.

VANRELL, J. P. **Manual de Medicina Legal: tanatologia**. 3. ed. São Paulo: J. H. Mizuno, 2007.

VIEGAS, J. **Human Cadaver Fungi Identified**. United States: Discovery Channel, 2006. Disponível em <<http://dsc.discovery.com/news/briefs/20060522/corpsefungi.html>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

VOORDEL, H. V. de; DIJCK, P. J. V. Determination of the time of death by fungal growth. **International Journal of Legal Medicine**, Berlin, v. 89, n. 2, p. 75-80, 1982.

VUJANOVIC, V.; HAMEL, C., YERGEAU, E.; ST-ARNAUD, M. Biodiversity and Biogeography of Fusarium Species from Northeastern North American Asparagus Fields Based on Microbiological and Molecular Approaches. **Microbial Ecology**, Estados Unidos, v. 51, p. 242–255, 2006.

WILSON, D. M.; MUBATANHEMA W.; JURJEVIC, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic Aspergillus species as related to economic and health concerns. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Estados Unidos, v. 504, p. 3-17, 2002.

ZAMPRONHA, V. C. de C.; OLIVEIRA, I. P. MONTEIRO, M. S. R.; SOUZA, H. de; SANTOS, K. J. B; ARAÚJO, A. A. Isolamento e identificação de dermatófitos de animais presentes no campus ii da universidade católica de Goiás. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v. 1, n. 1, p. 22-36, 2005.

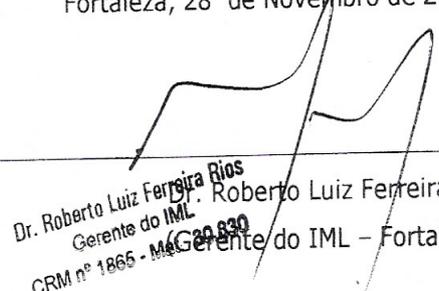
APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CIÊNCIA DO MÉDICO RESPONSÁVEL PELO SETOR ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA

Eu, Roberto Luiz Ferreira Rios, Gerente do Instituto Médico Legal de Fortaleza, conheço o protocolo de pesquisa intitulado: "Micologia Forense: o diagnóstico micológico na avaliação cronotanológica", desenvolvido por Renato Evandro Moreira Filho. Conheço seus objetivos e a metodologia que será desenvolvida, estando ciente de que o pesquisador não irá interferir no fluxo normal deste Serviço.

Fortaleza, 28 de Novembro de 2006


 Dr. Roberto Luiz Ferreira Rios
 Gerente do IML
 CRM nº 1866 - MA (C20830)
 Gerente do IML - Fortaleza)



APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: “Micologia Forense: a dinâmica da microbiota fúngica na investigação do período *post mortem*”

Investigador Principal/Responsável: Renato Evando Moreira Filho.

Local da Investigação:

Instituto Médico-Legal (IML) de Fortaleza-CE, Cemitérios Públicos do estado do Ceará e Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Objetivo do Estudo:

Identificar os fungos envolvidos no processo de decomposição do corpo e sua aplicação nos exames realizados pelos Institutos Médico-Legais.

Procedimento a ser realizado no Estudo:

Colheita de material (fios de cabelo, fragmentos de pele, fragmentos de pulmão e secreções do aparelho digestivo e genital) através de raspagem, *swab* ou biópsia com posterior análise laboratorial no Centro de Estudos de Micologia da Universidade Federal do Ceará a fim de isolar as espécies de fungos envolvidas no processo de decomposição do corpo.

Contato:

Se, em qualquer instante e por qualquer motivo, houver dúvidas sobre o estudo, o responsável deverá contatar o médico legista : Renato Evando Moreira Filho. Fone: 3101-5050.

Confidencialidade:

Compreendo que todas as informações geradas pelo estudo serão mantidas em sigilo, podendo ser inspecionadas somente pelo médico responsável, pelo Comitê de Ética e/ou por autorizado pelas autoridades de saúde ou segurança pública competentes. Em qualquer situação de uso dos resultados, o nome do periciando não será divulgado.

Consentimento:

Este formulário de consentimento contém as informações necessárias para fundamentar minha autorização para realização do estudo no periciando que sou responsável. Antes de assiná-lo, tive oportunidade de formular perguntas. Com base nessas informações, eu, voluntariamente, autorizo a realização do procedimento.

Nome do autorizador: _____
Assinatura do autorizador: _____
Assinatura do responsável: _____

APÊNDICE C**FICHA DE AVALIAÇÃO**
ANTROPOLÓGICA E MÉDICO-LEGAL

1) ASPECTOS ANTROPOLÓGICOS

IDENTIFICAÇÃO

a) Data da localização do corpo:

Ano: 2007

Mês: Janeiro Fevereiro Março Abril Maio Junho

Julho Agosto Setembro Outubro Novembro Dezembro

b) Sexo: Masculino () Feminino ()

c) Faixa Etária: 18-20 anos () 21-30 anos () 31-40 anos () 41-50 anos () 51-60 anos

d) Procedência: Fortaleza () Interior do Ceará ()

e) Prontuário: _____

2) ASPECTOS MÉDICO-LEGAIS:

a) Tempo estimado de morte

6-8 horas () 8-16 horas () 16-24 horas () 24-48 horas () mais de 72 horas

mais de 1 ano () mais de 2 anos ()

b) *Causa Mortis*

() homicídio () suicídio () infortúnio () indeterminada

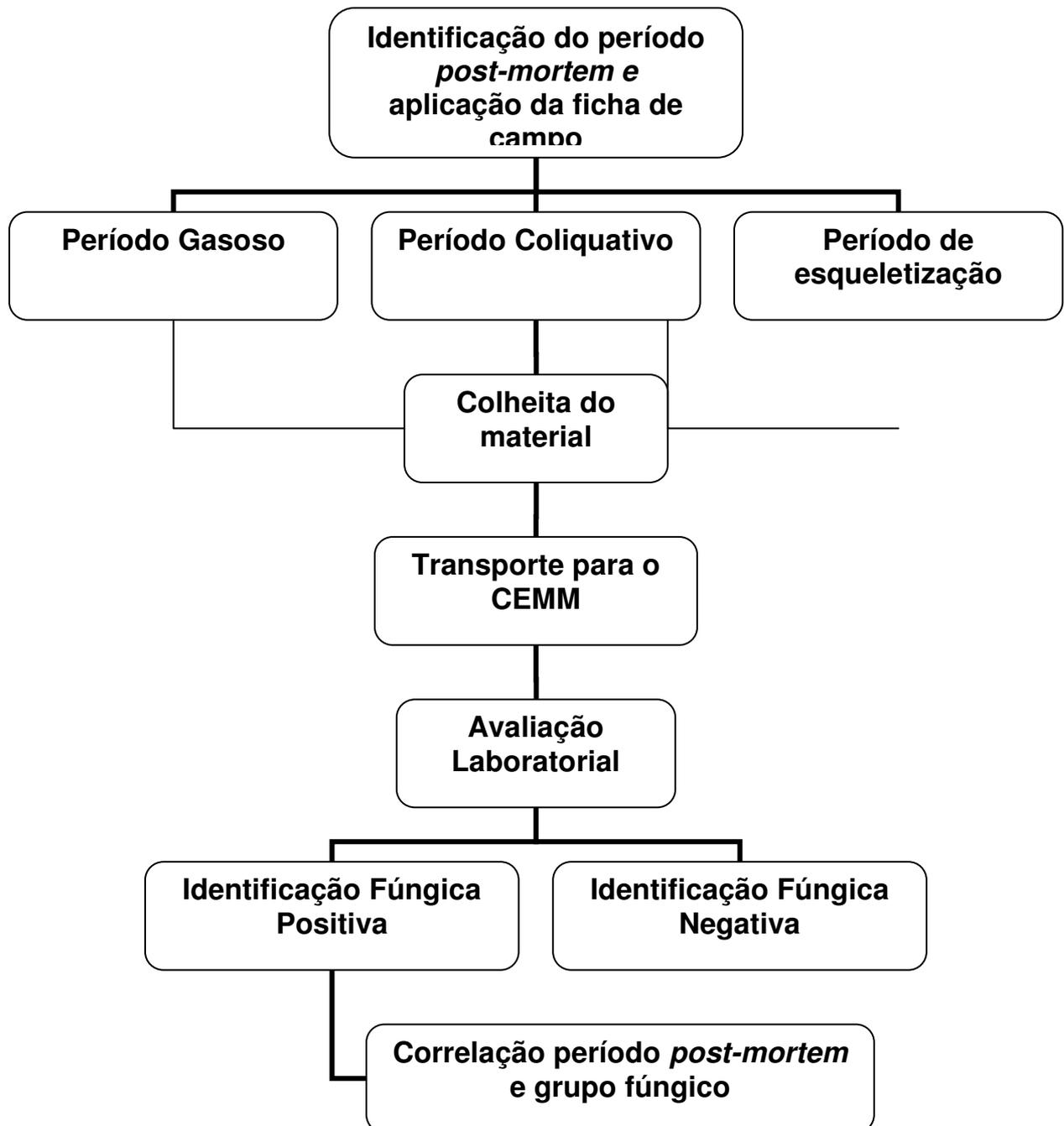
c) Possível contato com animais

Silvestres () domésticos () aquáticos ()

d) Local onde foi encontrado:

() cova rasa () jazigo () exposto em meio terrestre () exposto em meio aquático

APÊNDICE D

FLUXOGRAMA DA PESQUISA

ANEXOS

ANEXO A

CALENDÁRIO CRONOTANATOLÓGICO

(1) Critérios e Sinais de uso Médico-Legal

a) *Livor Mortis*:

Manchas de coloração púrpura avermelhadas que surgem em áreas de declive no corpo após depósito do sangue em pequenos vasos, por gravidade, em seguida ao cessar da circulação sanguínea. Em geral, torna-se evidente de 30 min. a 2 horas do *post mortem* e fixa-se definitivamente no espaço de 8 a 12 horas.

b) *Rigor Mortis* ou Rigidez Cadavérica e Flacidez muscular:

Com a cessação da produção de ATP, o complexo actina-miosina suspende o mecanismo de contração-relaxamento da fibra muscular. Ocorre, então, uma rigidez progressiva dos grupos musculares que podem mais ou menos obedecer a uma seqüência temporal. Inicia-se 2 a 4 horas após a morte com comprometimento progressivo da mandíbula e nuca (2h), membros superiores (2-4 horas), músculos torácicos e abdominais (4-6 horas) e membros inferiores (6-8 horas). A flacidez muscular aparece progressivamente na mesma seqüência, iniciando-se pela nuca em torno de 36-48 horas depois da morte.

c) Mancha verde abdominal:

Quase sempre surge na fossa ilíaca direita, sendo atribuída a sulfoxiemoglobina. Em média aparece entre 24 e 36 horas depois da morte, sendo mais precoce em locais de clima quente. Estende-se por todo o corpo depois do 3º ao 5º dia com acentuação progressiva da tonalidade, destacamento de amplos retalhos da epiderme e surgimento de desenhos vasculares com forma arborescente conhecidos como “circulação póstuma de Brouardel”.

d) Temperatura corporal:

Embora sujeita a inúmeras variações e erros, alguns autores citam como parâmetro de avaliação cronotanatológico e sugerem a seguinte fórmula:

$$\text{tempo transcorrido da morte (h)} = \frac{37^{\circ}\text{C} - \text{temperatura retal}}{1,5}$$

e) Enfisema ou Período Gasoso ou Putrefativo:

Resultado da disseminação da microbiota por todos os tecidos. A observação nas partes moles (tecido subcutâneo e músculos), exige que se passem dois a três dias. O máximo de intensidade pode ser atingido em uma semana – dependendo da temperatura e da umidade do ambiente. A decomposição protéica é máxima com grande desprendimento de compostos nitrogenados de odor repulsivo.

f) Período Coliquativo:

Há desaparecimento paulatino do enfisema e grandes perdas líquidas. Inicia-se cerca de três semanas após a morte e dura meses – conforme as condições climáticas. Nesse período, sucedem-se os esquadrões da morte – fauna e flora cadavéricas – até a completa destruição das partes moles e esqueletização do corpo.

g) Esqueletização:

Extremamente variável. Seu aparecimento dependerá sempre das condições climáticas e do ambiente. Pode ocorrer em período de tempo de meses a anos.

(2) Com base nos parâmetros citados utilizaremos o seguinte calendário para avaliação do tempo de morte:

a) Menos de 2 h:

Corpo quente flácido e sem livores

b) De 2 a 4 h:

Rigidez da nuca e mandíbula, esboço de livores.

c) De 4 a 6 h:

Rigidez dos membros superiores, da nuca e da mandíbula, livores relativamente acentuados.

d) Mais de 8 e menos de 16h:

Rigidez generalizada, livores, não-surgimento da mancha verde abdominal.

e) Mais de 16 e menos de 24 h:

Rigidez generalizada, esboço de mancha verde abdominal.

f) De 24 a 48h:

Presença de mancha verde abdominal, início de flacidez.

g) De 48 a 72 h:

Extensão da mancha verde abdominal

h) De 72 a 96h:

Enfisema ou Período Gasoso

i) Mais de 3 semanas:

Período Coliquativo

i) De 1 a 3 anos:

Desaparecimento das partes moles do corpo

Esqueletização completa

ANEXO B

Solução de Vancomicina adicionada ao meio ágar-Sabouraud a 2% glicose

- 1 – Após esterilização do meio ágar-Sabouraud a 2% de glicose, em autoclave a 121 °C, aguardou-se que o mesmo resfriasse até alcançar a temperatura de aproximadamente 65 °C;
- 2 – Em cabine de fluxo laminar, foi retirado 30 µL de solução de vancomicina (*Antibióticos do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil*) (100 mg/ml) e adicionado ao volume de 1 litro de meio de cultura;
- 3 – A solução foi homogeneizada por agitação manual;
- 4 – Realizada a transferência do meio para placas de Petri.

ANEXO C

Solução da Polimixina B adicionada ao meio ágar-Sabouraud a 2% de glicose

- 1 - Após esterilização do meio agar-Sabouraud a 2% de glicose, em autoclave a 121 °C, aguardou-se que o mesmo resfriasse até alcançar a temperatura de aproximadamente 65 °C;
- 2 - Em cabine de fluxo laminar, foi retirado 640 µL da solução de Polimixina B (16 mg/l) (*Alamar Técnico-Científica Ltda, São Paulo, Brasil*) e adicionado ao volume de 1 litro de meio de cultura;
- 3 – A solução foi homogeneizada por agitação manual;
- 4 – Realizada a transferência do meio para placas de Petri.

ANEXO D

MEIOS DE CULTURA

Ágar Sabouraud

OBJETIVO

É o principal meio de cultura usado na Micologia. Utiliza-se para o cultivo primário geral dos fungos (leveduras, filamentosos a alguns dimórficos), em especial para os dermatófitos, uma vez que, as principais características macro e microscópicas desse grupamento fúngico são classicamente descritas, a partir do seu crescimento nesse meio. A composição do ágar sabouraud foi, inicialmente, proposta por Raymond Sabouraud, em 1904, e vem apresentando inúmeras modificações com o passar dos anos, com alterações na quantidade de alguns componentes tais como a dextrose e a adição de substâncias inibidoras como o cloranfenicol e a cicloeximida. Dessa forma, descreveremos a sua composição clássica e falaremos de algumas modificações, mostrando suas vantagens frente a formulação original do meio.

COMPOSIÇÃO CLÁSSICA

Peptona	10 g
Dextrose	40 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000
	ml

PREPARO

Dissolver ágar, peptona e dextrose em água destilada, aquecendo em banho-maria. Autoclavar por 15 minutos, a 121°C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

MODIFICAÇÕES

- **Redução da concentração de dextrose para 20 g/litro (Ágar Sabouraud a 2% de dextrose, modificado por Emmons):** essa modificação eleva o pH final do meio de 5.9 para 7.0, favorecendo o crescimento e conidiogênese dos dermatófitos, sendo atualmente, a formulação preferida na maioria dos laboratórios de Micologia. Além de otimizar o isolamento dos dermatófitos, essa formulação ainda favorece o desenvolvimento de outros

fungos , tais como o *Blastomyces dermatitidis*, que se mostram incapazes de crescer na presença de teores mais elevados de dextrose.

- **Eliminação completa do teor de açúcar:** a retirada total da dextrose dificulta o aparecimento do pleomorfismo das colônias fúngicas, podendo, essa formulação, ser utilizada para conservação de cepas em estoque.
- **Adição de extrato de levedura:** a adição de 5 g de extrato de levedura/litro, torna o meio propício para o crescimento de colônias de dermatófitos com expressão de características morfológicas mais típicas de cada espécie.
- **Adição de antibióticos (ágar Sabouraud com cloranfenicol):** Essa formulação utiliza antibióticos de largo espectro, visando inibir o crescimento de bactérias, eventualmente presentes em materiais clínicos, as quais por possuírem maior velocidade de crescimento, podem esgotar o substrato do meio e impedir o crescimento de fungos. Os antibióticos mais utilizados são o cloranfenicol e a gentamicina. Abaixo, descreveremos a formulação do ágar Sabouraud a 2% de dextrose e acrescido de cloranfenicol

COMPOSIÇÃO

Peptona bacteriológica	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml
Solução de cloranfenicol	10 ml

PREPARO

Preparo da Solução de Cloranfenicol

Dissolver 0.05 g de cloranfenicol em 10 ml de álcool etílico.

Dissolver todos os componentes em água destilada sob aquecimento. Adicionar a solução de cloranfenicol. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob o nome Sabouraud agar Chloramphenicol (SANOFI-Institut Pasteur).

- **Adição de substâncias antibióticas e antifúngicas (ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloeximida):** nessa formulação, além da adição de antibióticos, já descrita

anteriormente, acrescentamos a cicloeximida (actidione), com a função de inibir o crescimento de fungos contaminantes do ar, os quais dificultam o crescimento e visualização dos fungos patogênicos. No entanto, a cicloeximida não tem ação seletiva apenas para fungos contaminantes, podendo inibir o crescimento de vários fungos patogênicos, tais como: *Cryptococcus neoformans* e várias espécies de *Candida*.

COMPOSIÇÃO

Peptona bacteriológica	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	10 g
Água destilada q.s.p	1000 ml
Solução de cloranfenicol	10 ml
Solução de cicloeximida	10 ml

PREPARO

Preparo da Solução de Cloranfenicol

Dissolver 0.05 g de cloranfenicol em 10 ml de álcool etílico.

Preparo da solução de cicloheximida

Dissolver 0.5 g de cicloeximida em 10 ml de acetona.

Preparo final do meio

Dissolver a peptona, dextrose e ágar em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Adicionar as soluções de cloranfenicol e cicloeximida. Autoclavar por 15 minutos, a 121°C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob os nomes *Agar Mycosel* (DIFCO) e *Agar Mycobiotic* (SANOFI-Institut Pasteur).

Ágar Batata

OBJETIVO

Usado para realização de microcultivo de fungos filamentosos e estoque de cepas fúngicas.

COMPOSIÇÃO

Infusão de batatas	500 ml
Dextrose	10 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada q. s. p	1000 ml

PREPARO

Cozinhar 250 g de batata-inglesa (*Solanum tuberosum*) descascadas em 500 ml de água, por 1 h. Filtrar a infusão de batatas através de gaze. Restituir o volume inicial de água (500 ml) e acrescentar 500 ml de água destilada. Adicionar o ágar e a dextrose, dissolvendo-os completamente. Autoclavar o meio por 15 minutos à 121°C e distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de vidro. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

Obs: Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob as denominações: Ágar batata (DIFCO), *Potato dextrose agar* (OXOID) e *Ágar Pomme-de-Terre* (Sanofi-Institut Pasteur).

CHROMagar Candida[®]**OBJETIVO**

Diferenciar espécies de *Candida*, baseando-se nas diferentes colorações adquiridas pelas colônias. Assim, por exemplo, colônias de *Candida albicans* são verde e *Candida tropicalis*, azul. Esse meio torna-se particularmente útil nos casos de infecção mista, facilitando a diferenciação das espécies envolvidas.

COMPOSIÇÃO

CHROMagar <i>Candida</i> [®] desidratado	47,7 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver o CHROMagar *Candida*[®] em água destilada esterilizada, aquecendo em banho-maria, por 2 minutos. Distribuir em placas de Petri médias.

OBS: Esse meio não deve ser autoclavado.

** Esse meio é adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob o nome de CHROMagar *Candida*[®] (CHROMagar[®] - PROBAC)

Ágar Fubá (Corn-meal) com Tween 80

OBJETIVO

Utilizado para realização de microcultivo de leveduras, pois estimula a formação de pseudo-hifas das diferentes espécies de *Candida*, além de estimular a produção de clamidoconídios característicos de *C. albicans*.

COMPOSIÇÃO

Fubá de milho	40g
Ágar bacteriológico	20 g
Tween 80	12 ml
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver o fubá de milho em 500 ml de água, fervendo em banho-maria por 40 minutos; restituir o volume de água inicial. Deixar esfriar e filtrar através de gaze e algodão. Em um recipiente separado, dissolver o ágar nos 500 ml de água destilada restantes. Juntar o ágar dissolvido com o fubá e acrescentar o Tween 80. Homogeneizar. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Distribuir em placas de Petri.

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob a denominação de *Agar Cornmeal* (DIFCO).

Meio para Fermentação de Carboidratos

OBJETIVO

Analisar a capacidade das leveduras em fermentar os diversos carboidratos.

COMPOSIÇÃO

Azul de bromotimol	0.03 g
Extrato de levedura	2.7 g
Peptona	4.5 g
Água destilada	600 ml
Etanol à 95%	1.8 ml

PREPARO

Dissolver o extrato de levedura e a peptona em água destilada. Separadamente, dissolver completamente o azul de bromotimol em etanol. Adicionar a solução de azul à mistura inicial e homogeneizar. Distribuir, 3 ml do meio, em tubos de ensaio contendo um tubo de Durham na posição invertida. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Deixar resfriar. Adicionar a cada tubo de ensaio, com o meio para fermentação, 1.5 ml de uma das soluções de açúcares utilizando pipetas estéreis. Homogeneizar. Conservar a 4°C por até um mês.

OBS: São os seguintes os carboidratos utilizados no teste de fermentação: maltose, dextrose, lactose, galactose, sacarose e trealose.

Meio para Assimilação de Carboidratos (Meio C)**OBJETIVO**

Analisar a capacidade das leveduras em assimilar diferentes carboidratos.

COMPOSIÇÃO**Meio basal**

Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

Solução Estoque de Yeast Nitrogen base

Yeast nitrogen base (Difco)	6.7 g
Água destilada q.s.p	100 ml

PREPARO

Meio Basal

Dissolver o ágar em água destilada, aquecendo-o em banho-maria. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Distribuir alíquotas de 40 ml.

Solução Estoque de Yeast Nitrogen Base

Dissolver o Yeast nitrogen base em 100 ml de água destilada e deionizada; esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 10 ml e estocar em frasco de cor âmbar na geladeira.

Preparo final do meio

Para cada alíquota de 40 ml do meio basal acrescentar 0.4 ml da solução estoque de Yeast Nitrogen Base. Atenção: só acrescentar a solução de Yeast nitrogen base quando o meio basal estiver com a temperatura aproximada de 48 °C.

Meio para Assimilação de Nitrato

(Meio N)

OBJETIVO

Testar a capacidade das leveduras em assimilar fontes inorgânicas de nitrogênio.

COMPOSIÇÃO

Yeast Carbon Base (DIFCO)	12 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver por aquecimento o ágar e o Yeast carbon base em água destilada. Distribuir em frascos com alíquotas de 20 ml. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Conservar a 4°C.

ANEXO E

TÉCNICAS DE MICROCULTIVO FÚNGICO

MICROCULTIVO PARA FUNGOS FILAMENTOSOS

Foi utilizada uma placa estéril contendo o meio ágar-batata, com espessura entre 4 a 5 mm. Com o amparo de uma lâmina de bisturi, foi retirado dessa placa um bloco no formato de um prisma retangular de aproximadamente 1 cm² de área.

Posteriormente, o bloco foi, então, disposto de forma asséptica sobre o aparato previamente montado com a lâmina de vidro. Incontinenti, foram feitos quatro repiques, um em cada face do retângulo superior do bloco de ágar-batata, sendo recoberto, posteriormente com uma lamínula. Foi colocado, então, em torno de 1 ml de água destilada estéril dentro da placa, com o cuidado de não molhar a lâmina, a fim de evitar a dessecação do material. Incubou-se, após o fechamento da placa de Petri, todo o material a temperatura de 25 a 28° C. Em torno de 20 dias após a incubação, foi desmontado o aparato retirando-se a lamínula que foi, dessa forma, visualizada à microscopia óptica com aumento de 40X após a montagem em uma nova lâmina de vidro com adição prévia de uma gota de lactofenol azul de algodão

MICROCULTIVO PARA LEVEDURAS

Foi executado o seguinte procedimento:

- 1 - Após o preparo do meio *Corn-Meal* com *Tween* 80, esse foi distribuído em placas de Petri de 70 mm de diâmetro, as quais foram acondicionadas a 4°C;
- 2 - A semeadura foi realizada com alça de platina estéril que tocou previamente a colônia de levedura. Foram, então, feitas três estrias paralelas sobre o ágar, de 3 a 4 cm de extensão e equidistantes 3 a 4 mm uma das outras com o cuidado de não perfurar o ágar com a alça;
- 3 - As estrias foram cobertas, na sua porção central, com lamínula esterilizada de 20 mm² de área. Pressionou-se delicadamente a lamínula com uma pinça de dissecação a fim de retirar o ar retido entre a lamínula e a superfície do ágar. As placas foram incubadas, incontinenti, a

30° C por um período de 48 a 96 horas. Quando não observado crescimento adequado, manteve-se a incubação nas mesmas condições por até seis dias;

4 - No momento da observação, a placa teve sua tampa removida e posicionada no microscópio óptico. A área estriada foi examinada, inicialmente, com as objetivas de 10X e 40X, visando à detecção das estruturas.

ANEXO F

PROVAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA

ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO

O procedimento realizado foi o seguinte:

1 - Preparou-se uma suspensão recente da levedura (24 h), da coleta previamente identificada, em 1 ml de água destilada esterilizada, ajustando-se posteriormente a turbidez de acordo com o padrão número 5 da escala de McFarland;

2 - O meio *Yeast Carbon Base* (Difco) foi previamente preparado em conformidade com as normas do fabricante e armazenado em tubos de 20 X 200 mm, contendo 20 ml do meio, incubados a 4°C;

3 - No instante da sua utilização, os tubos contendo o meio foram fundidos em forno de microondas e, em seguida, resfriados até a temperatura de 50° C em banho maria;

4 - Após a estabilização da temperatura do meio, 1 ml da suspensão da levedura foi adicionada a 20 ml do meio, sendo que essa mistura foi vertida em placa de Petri esterilizada de 90 x 15 mm. Incontinenti, foram realizados suaves movimentos de rotação da placa a fim de homogeneizar o inoculo;

5 - Após a solidificação do meio, a placa foi disposta sobre a cartela-guia para leitura posterior;

6 - Pequenas alíquotas das fontes de nitrogênio foram distribuídas equidistantemente sobre o ágar, com o auxílio de espátulas individuais esterilizadas;

7 - Foi adicionada uma alíquota de peptona a fim de ser utilizada como controle positivo;

8 - As placas foram, então, incubadas a temperatura de 25 a 30° C, durante 48 h, com a face que contém o meio com as fontes de nitrogênio voltada para cima; 9 - A leitura foi feita e considerou positiva quando observado um halo de turvação em torno das fontes nitrogenadas.

FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Realizou-se a prova por meio da inoculação de uma suspensão de leveduras, de uma coleta previamente identificada, em um tubo de ensaio contendo o meio de cultura, solução do carboidrato desejado a 2% e um tubo de Durham invertido. O procedimento foi executado da seguinte forma:

1 - Foi preparada uma suspensão da levedura a ser testada em 1,2 ml de água destilada esterelizada, ajustando a turbidez de acordo com o padrão 5 da escala de McFarland;

2 - O meio basal foi alíquotado em seis porções iguais, sendo que cada uma foi acrescida de uma solução do carboidrato a ser utilizado. As soluções dos respectivos carboidratos foram distribuídas em tubos de ensaio de 125 x 10 mm, identificados com a letra inicial do carboidrato, em alíquotas de 4 ml;

3 - Com o auxílio de uma pipetador automático, foram inoculados 200 microlitros da suspensão da levedura nos tubos de ensaio contendo os carboidratos dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose e trealose (Figura 10);

4 - Os tubos foram incubados a 25-30 °C, por um período de 28 dias, sendo a leitura realizada em 24h e, subsequentemente, a cada 5 dias, observando-se a produção de gás (formação de bolha no interior do tubo de Durham).

ANEXO G

TERMO DE CONSENTIMENTO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Estadual do Ceará
 Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60740-000 Fortaleza-Ceará
 Fone: (085) 3101 9810 e-mail:cep@uece.br



Título: Micologia Forense: o diagnóstico micológico na avaliação cronotanatólica
Processo No. 064969333-9
FR CONEP 118526
Nome: Renato Evando Moreira Filho (**responsável**)
Orientadora: Rossana Aguiar Cordeiro

PARECER

O projeto tem como objetivo investigar as características microbiológicas dos grupos de fungos partícipes de flora pós-morte e no processo de degradação cadavérica. A amostra será constituída por corpos humanos em três fases de decomposição cadavérica (Período gasoso, período coliquativo e período de esqueletização) com amostra inicial de vinte periciados em cada grupo submetidos à perícia médico-legal por médicos legistas do IML de Fortaleza, Ceará, no período de março de 2007 a março de 2008, tendo como tempo estimado de morte o intervalo avaliado no exame pericial, em maiores de 18 e menores de 60 anos de idade, vítimas de morte violenta- homicídio, suicídio ou infortúnios como asfixias, envenenamento, traumas mecânicos, descargas elétricas, dentre outros. Em termos metodológicos, caracteriza-se como um estudo do tipo longitudinal, com observação dos dados antropológicos e médico-legais dos sujeitos da pesquisa e laboratoriais dos fungos partícipes do processo. O projeto não apresenta riscos e os benefícios são bastante claros. O termo de consentimento livre e esclarecido, o orçamento e o cronograma apresentados estão adequados.

O projeto está bem estruturado e é relevante havendo retorno para a comunidade. O projeto atende aos ditames da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde-CNS e portanto, e portanto, está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará – CEP-UECE.

Maria Salete Bessa Jorge
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UECE

PUBLICAÇÕES

CARTA DE SUBMISSÃO – ARTIGO 1

Mensagem Original -----

Assunto: A manuscript number has been assigned

De: "Forensic Science International" <fs.international@elsevier.com>

Data: Qui, Julho 10, 2008 6:09 am

Para: brilhante@ufc.br

Dear Brilhante,

Your submission entitled "Trichophyton mentagrophytes perforates hair of adult corpses in the gaseous period" has been assigned the following manuscript number: FSI-D-08-00325.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/fsi/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

N. Meehan

Journal Manager

Forensic Science International

ARTIGO 1**FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL – Short Communication*****Trichophyton mentagrophytes* perforates hair of adult corpses in the gaseous period**

R.E. Moreira Filho^{1,2}, L.D.M. Pantoja^{1,2}, E.P. Caetano^{1,4}, J.J.C. Sidrim^{1,2,3}, R.A.

Cordeiro^{1,2,3,4}, M.F.G. Rocha^{1,2,5}, R.S.N. Brilhante^{1,2,3*}

¹ *Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Brazil*

² *Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Brazil*

³ *Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Brazil*

⁴ *Department of Biological Science, State University of Ceará, Brazil*

⁵ *Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Brazil*

*Author for correspondence: R.S.N. Brilhante

Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil.

Fax: 55 (85) 3295-1736

E. mail: brilhante@ ufc.br

ARTIGO SUBMETIDO : FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL

Abstract

Trichophyton mentagrophytes was used to test its potential to perforate hair of adult corpses in the gaseous period. This protocol was compared with positive (prepubescent children hair) and negative controls (health adults hair). Strain of *Trichophyton rubrum* was also used as negative perforation control. Perforations were found in all the corpse and prepubescent children hair samples after 12 – 14 days exposed to *T. mentagrophytes*, and were absent in the hair samples of healthy adults. Furthermore, hair perforation was not observed with *Trichophyton rubrum*. Our preliminary findings suggest the use of *T. mentagrophytes* as a potential marker of the death interval in forensic science.

Keywords: *Trichophyton mentagrophytes*, *in vitro* hair perforation, forensic

Introduction

The advances in forensic medicine and the use of biological markers have improved the *post mortem* analysis of the corpses, which is exemplified by the recent findings against estimation of the time of death only based on the temperature measurement in body sites [1,2]. Thus, the need for a wider application of bio- and thanatochemical analyses to estimate precisely the *post mortem* period. The use of sophisticated models [3] appears to be efficient to estimate time of death, and its combination with biomarkers, e.g., flies [4], may improve forensic techniques. Many others agents may be candidates for period of death estimation.

The fungus *Trichophyton mentagrophytes* is commonly isolated for laboratorial diagnosis, such as *in vitro* hair perforation test [5]. The *in vitro* hair perforation test, commonly performed in many mycology laboratories, uses the head hair of blond prepubescent children as a positive control. In that age group, the hair is generally fine and soft, with no medula, which facilitates verification of the capacity of *T. mentagrophytes* to perforate the hair, which is not observed in the hair from healthy adults due its higher resistance and the influence of hormonal and immunological factors.

Based on the gradual absence of immunological factors after death, we considered the possibility of using *T. mentagrophytes* to estimate the *post mortem* period by hair perforation test. Thus, the main goal of this study was to investigate the *in vitro* perforation test by *T. mentagrophytes* of hair from adult corpses in *post mortem* period (gaseous period).

Material and methods

Ethical aspects

The present study was approved by the Research Ethics Committee from State University of Ceará (approval under number 064969333-9).

Hair samples

Scalp hair samples were collected from three different groups for the hair perforation test, as follows: (i) hair from corpses (n=12; victims with ages ranging from 18 to 35 years old), (ii) hair from healthy adults (n=12; with ages ranging from 18 to 35 years old; negative control), and (iii) hair from blond prepubescent children (n=4; positive control). The hair samples were collected with tweezers and sterile scalpel. None of the living subjects reported recent use of antifungal medicines or similar scalp treatments. The corpses were all from violent death victims, without report of clinical infection caused by fungal microorganisms, and were selected in the gaseous period (between 3 and 5 days after death).

*Selections of strains of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum**

Four strains of *T. mentagrophytes* and one strain of *T. rubrum* (used as negative control), belonging to the collection of the Specialized Medical Mycology Center (Department of Pathology and Forensic Medicine of Federal University of Ceará, Brazil), were used in this study.

*Exposure to *T. mentagrophytes* and to *T. rubrum**

Each strain was inoculated in a small Petri dish (7mm diameter x 15mm height) containing agar-bacteriological (Bacto™ Agar, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md). Hair samples were placed into the Petri dishes together with the strains,

according to each previous described protocol. Then, the dishes were incubated at 25 to 28° C for up to 30 days. Dishes were evaluated daily, and for each analysis a part of the hair sample was removed together with the fungi for staining with lactophenol blue. Samples were analyzed under an optical microscopy at 10x and 40x magnification. The test was considered positive when perforation was observed in at least half the thickness of the hair [6].

Results

There were perforations noted in the hair from all the corpses and positive controls (hair from children) exposed to *T. mentagrophytes*. This positive result occurred between the days 12 and 14 in children, and 13th and 14th in corpses, after exposure to *T. mentagrophytes* (Table 1). The microscopic characteristics of the positive samples were evidenced as the presence of a perforated area in marrow and/or cortex of the hair penetrating at least half of the hair structure (fig. 1). The hair samples from the 12 healthy adults (negative control) did not present positive perforation during the 30 days of observation, in any of the samples, in any of the strains. Additionally, in none of sample tested with *T. rubrum* hair perforation was observed.

Discussion

The *in vitro* hair perforation test, initially described by George and Ajello [7] is based on the ability of the *T. mentagrophytes* to perforate hair. The standard test is effective and simple to perform, and it is commonly used on blond children's hair because of their low natural resistance, absence of saturated fatty acid chains which allow the perforation.

Although the defense barriers of the human organism obviously cease to function after death, this does not happen instantaneously [8]. It occurs as part of a natural process of decomposition that involves cellular death and the proliferation of microorganisms during

phases after death, which are generally divided into four periods: greenish discoloration period (from 24 at 36 hours), gaseous period (in days), deterioration period (in months) and skeletonization period (in years) [9]. Once started, the several phenomena of cadaver degeneration happen continuously. Besides the hormonal influence during life, the morphology of the hair also undergoes changes after death [10]. The cuticle, which during life works as a protective barrier, degenerates after death, allowing attack by microorganisms such as bacteria and fungi.

Besides the vast knowledge in microbiological agents, there is still limited description in the medical literature of the interaction between fungi and human hosts in the *post mortem* period [11]. We have observed the action of hair-perforating enzymes of *T. mentagrophytes* on the scalp hair of adult corpses in comparison with the hair from the healthy adult. The perforation occurred between the 13th and 14th day of incubation, i.e. the gaseous period of adult cadaver decomposition. This indicates that the decay of immunological factors occurs during the gaseous *post mortem* period, besides the natural after-death degradation of the hair.

In summary, our results open the perspectives for an effective characterization of the decay of these barriers and the fungus-host interaction after death. Thus, further studies are necessary to verify the potential of fungous species, such as *T. mentagrophytes*, in order to use it as a marker of the time of death in the forensic science.

References

1. M. Kaliszan, R. Hauser, Estimation of the time of death based on the measurements of the eye temperature in comparison with other body sites. *Arch Med Sadowej Kryminol* 57 (2007):399-405
2. P. Verica, B. Janeska, A. Gutevska, A. Duma, Post mortem cooling of the body and estimation of time since death. *Soud Lek* 52 (2007):50-56
3. G. Mall, W. Eisenmenger, Estimation of time since death by heat-flow Finite-Element model part II: application to non-standard cooling conditions and preliminary results in practical casework. *Leg Med* 7 (2005):69-80
4. J.D. Manlove, R.H. Disney, The use of *Megaselia abdita* (Diptera: Phoridae) in forensic entomology. *Forensic Sci Int* 175 (2008):83-84
5. I.F. Salkin, G.E. Hollick, N.J. Hurd, M.E. Kemna, Evaluation of human hair sources for the *in vitro* hair perforation test. *J Clin Microbiol* 22 (1985):1048-1049
6. R.S.N. Brilhante, R.A. Cordeiro, M.F.G. Rocha, A.J. Monteiro, T.E.F. Meireles, J.J.C. Sidrim. Tinea capitis in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: the role of *Trichophyton tonsurans*. *Intern J. Dermatol* 43 (2004): 575 -579.
7. L. Ajello, L.K. Georg, In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol* 8 (1957):3-17
8. J.I. Coe, W.J. Curran, Definition and time of death. In: W.J. Curran, A.L. McGarry, C.S. Petty. Ed. *Modern Legal Psychiatry and Forensic Science* Philadelphia: F.A. Davis. 1980
9. D.J. Di Maio, V.J. Di Maio VJ, *Forensic Pathology*. 2nd ed. CRC Press Inc., Boca Ratón, 1993
10. J.H. Collier. Estimating the *post mortem* interval in forensic cases through the analysis of *post mortem* deterioration of human head hair. (Master of Arts). Louisiana State University, 2005

11. D.O. Carter, M. Tibbett, Taphonomic mycota: Fungi with forensic potential. *J Forensic Sci* 48 (2003):168-171

Table 1. *In vitro* hair perforation by *Trichophyton mentagrophytes*

Hair origin	Strain	Perforation day (+)	Microscopic characteristic
Corpses	-	-	-
1	CEMM 03 - 3 - 018	13th	Perforation of the cortex
2	CEMM 03 - 3 - 018	14th	Perforation of the cortex
3	CEMM 03 - 3 - 018	13th	Perforation of the cortex
4	CEMM 01 - 4 - 194	14th	Perforation of the cortex
5	CEMM 01 - 4 - 194	14th	Perforation of the marrow
6	CEMM 01 - 4 - 194	13th	Perforation of the cortex
7	CEMM 01 - 5 - 038	13th	Perforation of the cortex
8	CEMM 01 - 5 - 038	13th	Perforation of the cortex
9	CEMM 01 - 5 - 038	13th	Perforation of the cortex
10	CEMM 01 - 1 - 015	14th	Perforation of the cortex
11	CEMM 01 - 1 - 015	14th	Perforation of the cortex
12	CEMM 01 - 1 - 015	14th	Perforation of the cortex
Child	-	-	-
1	CEMM 03 - 3 - 018	12th	Perforation of the cortex
2	CEMM 01 - 4 - 194	14th	Perforation of the cortex
3	CEMM 01 - 5 - 038	13th	Perforation of the marrow
4	CEMM 01 - 1 - 015	14th	Perforation of the cortex
Healthy adults	-	-	-
1	CEMM 03 - 3 - 018	-	-
2	CEMM 03 - 3 - 018	-	-
3	CEMM 03 - 3 - 018	-	-
4	CEMM 01 - 4 - 194	-	-
5	CEMM 01 - 4 - 194	-	-
6	CEMM 01 - 4 - 194	-	-
7	CEMM 01 - 5 - 038	-	-
8	CEMM 01 - 5 - 038	-	-
9	CEMM 01 - 5 - 038	-	-
10	CEMM 01 - 1 - 015	-	-
11	CEMM 01 - 1 - 015	-	-
12	CEMM 01 - 1 - 015	-	-

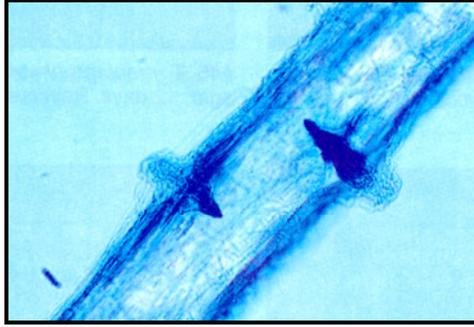


Figure 1: The microscopic characteristics of the positive samples with the presence of a perforated area in hair

ARTIGO 2

**Fungal Microbiota Dynamics as a Postmortem Investigation Tool: Focus on *Aspergillus*,
Penicillium and *Candida* species**

Moreira Filho, R. E.^{a,b}; Cordeiro, R. A.^{a,c,d}, Sidrim, J.J.C.^{a,c}, Rocha, M.F.G.^{a,e},
Pantoja, L. D. M.^{a,b}, Caetano, E.P.^a, Monteiro, A. J.^f, Brilhante, R. S. N.^{a,c*}.

^a Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Department of Biological Science, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^e Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^f Department of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

***Corresponding author:** R.S.N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax: 55 (85) 3295-1736 E. mail: brilhante@ ufc.br

ABSTRACT

Certain groups of fungi have been associated to decomposed mammalian cadavers. Therefore, the present research investigated the presence of fungi during three decomposition stages: the bloated, putrefaction and skeletonization. The samples were gathered at the city Fortaleza and from public cemeteries morgue in northeastern Brazil and the material was submitted to conventional mycological analysis. The main isolated fungi were *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp and *Candida* spp in the bloated stage (n= 34 cadavers) and in the putrefaction stage (n= 06 cadavers). Concerning to eskeletonization stage (n= 20 cadavers) the main fungi were *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp and *Mucor* spp. These findings already permit tracing out a horizon for deeper understanding of the subject. However, much more research will be necessary to develop this new segment of mycology, enabling the frequent use of its findings in forensic science in human cadavers.

Key words: Fungi, Forensic Mycology, Forensic Medicine, time of death

INTRODUCTION

Forensic mycology is a relatively new term describing the study of the species of fungi that can have application in forensic medicine, particularly determination of the fungal groups that can help establish the time of death [1].

Studies of the relevant role of fungi in postmortem decomposition have been increasing because the corpse is a plentiful source of organic material [2], with a rising number of experimental descriptions and case studies in forensic mycology [1, 3]. These studies have shown that certain groups of these microorganisms can provide valuable clues in estimating the time of death.

Although there have been some descriptions published on the participation of fungi in the postmortem process [3], few have focused on the species that are present at each stage of decomposition and the possible application of this information to forensic medicine. Besides this, the isolation of certain fungal species in determined geographical areas also helps in the characterization and classification of the typical regional microorganisms, in view of the variation of species in contact with corpses under different growth conditions [4].

In 2003, Carter & Tibbett [1], demonstrated how and why field mycology might provide a further tool towards the investigation of scenes of crime concealed in forest ecosystems. The fruiting structures of certain fungi, the ammonia and the postputrefaction fungi, have been recorded repeatedly in association with decomposed mammalian cadavers in disparate regions of the world [1]. Based in these reports, the present research investigated the presence of fungi during three decomposition stages: the bloated, putrefaction and skeletonization stages.

MATERIAL AND METHODS

- Ethical aspects

The present study was previously submitted to evaluation by the research ethics committee of State University of Ceará and obtained approval under number 064969333-9.

- Sample collection sites

The samples were gathered at the city morgue in Fortaleza, in the state of Ceará (northeastern Brazil), and from public cemeteries in that state. All the cadavers were examined between January and December 2007.

- Study subjects

The samples were taken from human corpses in three stages of decomposition: bloating stage (n= 34), putrefaction stage (n= 6) and skeletonization stage (n= 20). Each cadaver was evaluated in advance to establish the postmortem interval. All subjects were between the ages of 18 and 60 at death, victims of unnatural death – homicide, suicide, accidental asphyxiation, poisoning and electrocution, traffic accidents and other mechanical traumas, among others.

- Biosafety

To preserve the integrity of the material collected and to protect the researchers' health, biological masks and disposable caps, gowns, slippers and gloves were worn at all times [5].

- Gathering the samples

The cadaver material was taken from the sites with the greatest probability of fungal growth: mouth, rectum, vagina, under the foreskin, lungs, skin, scalp hair, clothing and the surrounding area (grave soil and coffin fragments). The skin samples were taken by scraping with a sterile scalpel and the hair samples were obtained with sterile tweezers. Sterile swabs were used to collect material from the mucosas of the mouth, rectum, vagina and under the foreskin, using a rotating movement. At least two samples were collected from each site, one for direct examination and the other for culturing [6]. In the case of the samples from the pulmonary sites, a biopsy was performed with a sterile scalpel and a single fragment 1.0 cm in length was retrieved from the main bronchial tube and one from the peripheral bronchial tube. For characterization of the cadaver environment in the skeletonization stage, when organic material is scanty, samples were taken of the clothing, grave soil and coffins. The samples were placed in a test tube with 3 ml of saline solution at a temperature of 25 to 28° C and sent to the Specialized Medical Mycology Center (CEMM) of the Department of Pathology and Legal Medicine of Ceará Federal University.

- Laboratory processing

After specimen collection, all cadaver material was transported to the Medical mycology Specialized Center at the Faculty of Medicine at Federal University of Ceará, Brazil. The samples were submitted to conventional mycological analysis. These specimen were clarified in 40% potassium hydroxide (KOH) and placed between slides and slide covers for microscopic examination at 10x and 40x. Along with direct examination, an aliquot of the material was seeded in dishes containing 2% glucose Sabouraud agar, Sabouraud agar with vancomycin plus polymixin B (to inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative contaminating bacteria, respectively) and Sabouraud agar with vancomycin plus polymixin B

and cycloheximide (to inhibit contaminating airborne fungal strains). The dishes were incubated at 25 to 28° C for up to 20 days, with daily observations until fungal growth was detected. Upon detection of fungal colonies, micro and macromorphological tests were performed, along with biochemical tests (e.g., nitrogen assimilation test and carbohydrate fermentation test), to identify the fungal species isolated.

RESULTS

It was carried out 234 direct examinations of clinical specimens from corpses in the bloated stage, 42 in the putrefaction stage and 120 in the skeletonization stage. None of them produced results of any diagnostic value because the intense bacterial growth prevented visualization of the fungal structures at this step of the study.

From the 34 cadavers in the bloated phase, we collected 234 samples for laboratory analysis, distributed among mucosas (n=102), hair (n=64), skin (n= 34) and lungs (n=34). The quantitative association between the fungal genera and external collection sites (hair and skin) in the bloated stage was as follows: hair: *Aspergillus* spp (n= 31), *Penicillium* spp (n= 11), *Candida albicans* (n= 4) and *C. parapsilosis* (n= 5), *Trichosporon* spp (n= 4), *Mucor* spp (n= 2), *Geotrichum* sp (n= 1) and *Acremonium* sp (n= 1); skin: *C. albicans* (n= 5) and *C. parapsilosis* (n= 5), *Aspergillus* spp (n= 7), *Penicillium* spp (n= 4) and *Mucor* spp (n= 3). The results oral, genital and rectal mucosas were as follows: *Aspergillus* spp (n= 16), *C. albicans* (n= 10) and *C. parapsilosis* (n= 6), *Penicillium* spp (n= 5), *Acremonium* sp (n= 1), *Fusarium* sp (n= 1), *Trichosporon* sp (n= 1) and *Mucor* sp (n= 1). The following fungi were found in lungs: *Aspergillus* spp (n= 8), *C. albicans* (n= 2), *C. parapsilosis* (n= 3), *Penicillium* spp (n= 2) and *Trichoderma* sp (n= 1) (Fig 1).

The samples taken from the external sites (hair and skin) of the six corpses examined in the putrefaction stage yielded the following genera: hair: *Aspergillus* spp (n= 2), *Penicillium* sp (n= 1) and *Acremonium* sp (n= 1); and skin: *Aspergillus* sp (n= 1) and *C. albicans* (n= 1). The fungi present oral, genital and rectal mucosas were: *C. guilliermondii* (n= 2) and *C. albicans* (n= 2); *Penicillium* sp (n= 1). Only one *C. albicans* strain was found in lungs found (Fig 2).

Finally, the samples taken from the 20 corpses evaluated in the skeletonization stage yielded 104 isolates of filamentous fungi and 3 isolates of yeasts. The sites of the corpses themselves (hair and bone) produced the following genera: hair: *Aspergillus* spp (n= 12), *Penicillium* spp (n= 8), *Mucor* spp (n= 4); *Trichoderma* sp (n= 1) and *Trichosporon* sp (n= 1); and bone: *Penicillium* spp (n= 11), *Aspergillus* spp (n= 9) and *Mucor* spp (n= 3). The nearby sites examined (clothing, soil and coffins) yielded the following genera: clothing: *Aspergillus* spp (n= 12), *Penicillium* spp (n= 10); *Mucor* spp (n= 4) and *Acremonium* sp (n= 1); soil: *Aspergillus* spp (n= 7), *Penicillium* spp (n= 5); *Mucor* spp (n= 3) and *Trichosporon* sp (n= 1); and coffins: *C. albicans* (n= 1) (Fig 3).

DISCUSSION

Due to the many factors – environmental and individual characteristics of corpses – that affect the growth of fungi, it is not surprising that there are differences between the few reports available to forensic mycology researchers [4] and the findings described in regions with peculiar characteristics, such as northeastern Brazil.

One point stands out in the our results of fungal isolation in all the stages evaluated (bloated, putrefaction and skeletonization), namely that direct mycological examination is not fruitful. The bacterial kinetics promotes faster division of the prokaryotic cells in comparison with the eukaryotic fungal cells. The latter also require a narrower range of temperature, pH,

moisture and luminosity conditions for adequate division and population dynamics [7]. Therefore, direct mycological examination by optical microscope is of negligible value to identify the postmortem fungi. Instead, it is essential in forensic mycology studies to use culture media and/or other complementary laboratory methods to identify the fungi presence.

Regarding the form of asexual fungal division, the filamentous form prevailed in the bloated and skeletonization stages. As known, the majority of fungi reproduce asexually in nature, besides the fact that many of their representatives are airborne strains and can easily grow on practically any substrate (e.g., *Penicillium* spp and *Aspergillus* spp) [8]. In contrast, yeasts predominated in the putrefaction stage. In these sites the isolation of yeasts is more frequent because they are part of the normal microbiota of these areas.

Until the present study there were only a limited number of reports of the isolation of the fungal microorganisms cited here under conditions of corpse putrefaction [2, 4]. As a rule this absence of information was due to the failure to collect and investigate material under those conditions. Although the results demonstrated here are only descriptive, the mere presence of these fungi under inhospitable conditions is reason for greater interest in fungi in forensic medicine as a way to establish the time of death.

The external collection sites were more propitious than the internal ones for fungal growth, both of airborne fungi and yeasts, especially the genus *Aspergillus* and *Candida*, respectively. This corroborates other works on the postmortem alterations caused by fungi [9]. The yeasts also grew more on the skin than in the capillary region. This fact can be explained by the after-death rupture of the skin barriers and greater contact with mucous secretions, besides their possible presence in the skin microbiota.

Another interesting observation regarding our postmortem isolation of fungi is the absence of dematiaceous fungi (able to produce pigment, generally melanin) among those isolated in this study. This fact may be due to the growth characteristics common to various

representatives of this group, which usually grow slowly, producing lesions with chronic evolution. Also, the intense competition with bacteria, hyaline fungi and insects could have contributed to their absence in this study.

Although observation of the presence of fungi on the surface of corpses by forensic medical practitioners is not recent, the isolation of these organisms is not done routinely. Since their description can even give indications on the place of death, additional studies are necessary for the use of fungi as a forensic tool [2].

The present study is only a starting point, and the results are not yet sufficient to allow the presence of fungi to act as effective biological markers of the time of death. However, it does demonstrate that there are differences in the fungi isolated during the process of corpse decomposition, especially by the isolation of fungi such as *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp and *Candida* spp. These results indicate that the presence of fungi on, in and around cadavers can provide additional information to determine the time of death as accurately as possible. It must be pointed out that further research with larger samples and more detailed description of conditions is necessary to ratify the findings presented here and to establish the real importance of mycology as a tool to assist with forensic medicine, as is already the case of forensic entomology [10].

Finally, these findings already permit tracing out a horizon for deeper understanding of the subject. However, much more research will be necessary to develop this new segment of mycology, enabling the frequent use of its findings in forensic science, as is already the case with entomology.

REFERENCES

1. Carter DO, Tibbett M (2003) Taphonomic Mycota: Fungi with forensic potential. *J. Forensic Sci*, 48 (1): 168-171.
2. Ishii K (2006) Analysis of fungi detected in human cadavers. *Leg Med (Tokyo)*. 8(3):188-190.
3. Hitosugi M, Ishii K, Yaguchi T, Chigusa Y, Kurosu A, Kido M, Nagai T, Tokudome S (2006) Fungi can be a useful forensic tool. *Leg Med (Tokyo)*, 8 (4): 240 - 242.
4. Ishii K, Hitosugi M, Yaguchi T, Tokudome, S (2007) The importance of forensic mycology. *Leg Med (Tokyo)*, 9(5): 287.
- 5 Brunicardi FC, Anderson DK, Brandt ML (2006) *Schwartz's Principles of Surgery Self-assessment and Board Review*. New York: McGraw Hill, 1: 123-153.
6. Balows A, Hansler Jr WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (1992) *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed: ASD, pp: 15-28.
7. Murray PR, Drew, WL, Kobayashi GS (1990) Thompson Jr., J. H. *Medical Microbiology*. The C. V. Mosby Company, pp: 8-22.
8. Sharma OP (1988) *Textbook of Fungi*. McGraw-Hill, pp: 22-32.

9. Collier JH. Estimating the postmortem interval in forensic cases through the analysis of postmortem deterioration of human head hair (2005) Master of Arts Dissertation, Louisiana State University, pp: 1-5.

10. Menezes AJ, Kanchan T, Monteiro F, Manipady S, Rao P (2007) Forensic mycology. *Leg Med (Tokyo)* 9 (1), 48.

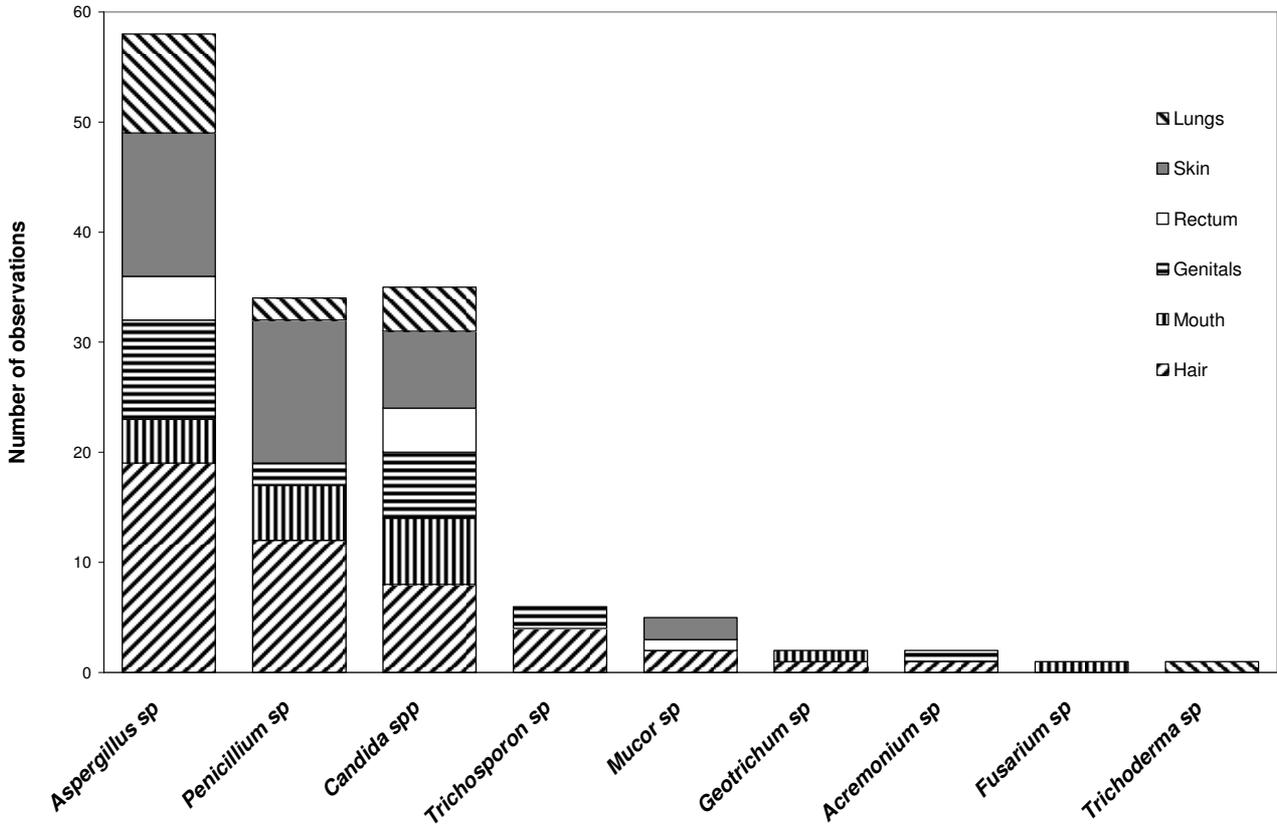


Fig. 1 – Bloating Phase and Fungal Genera Isolated

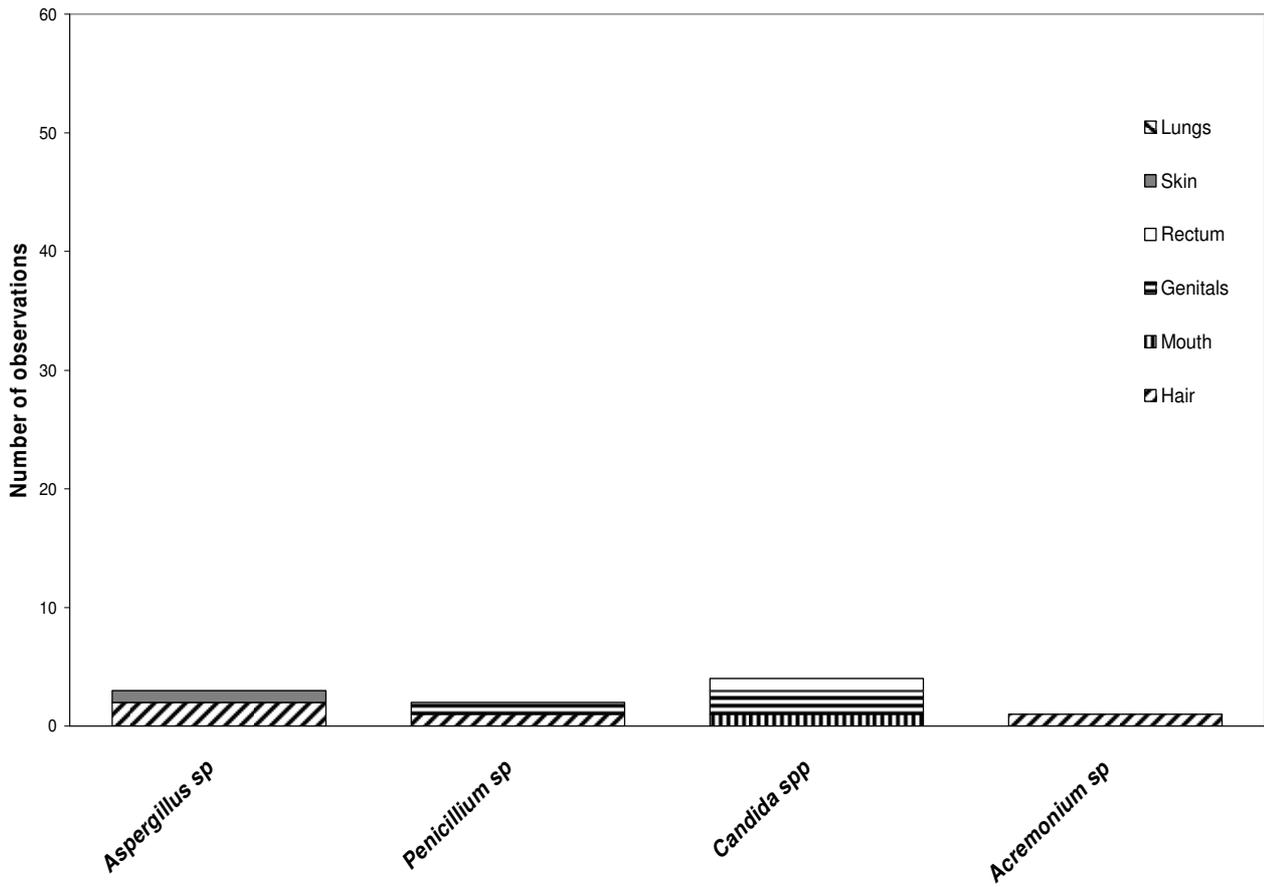


Fig. 2 – Putrefaction Phase and Fungal Genera Isolated

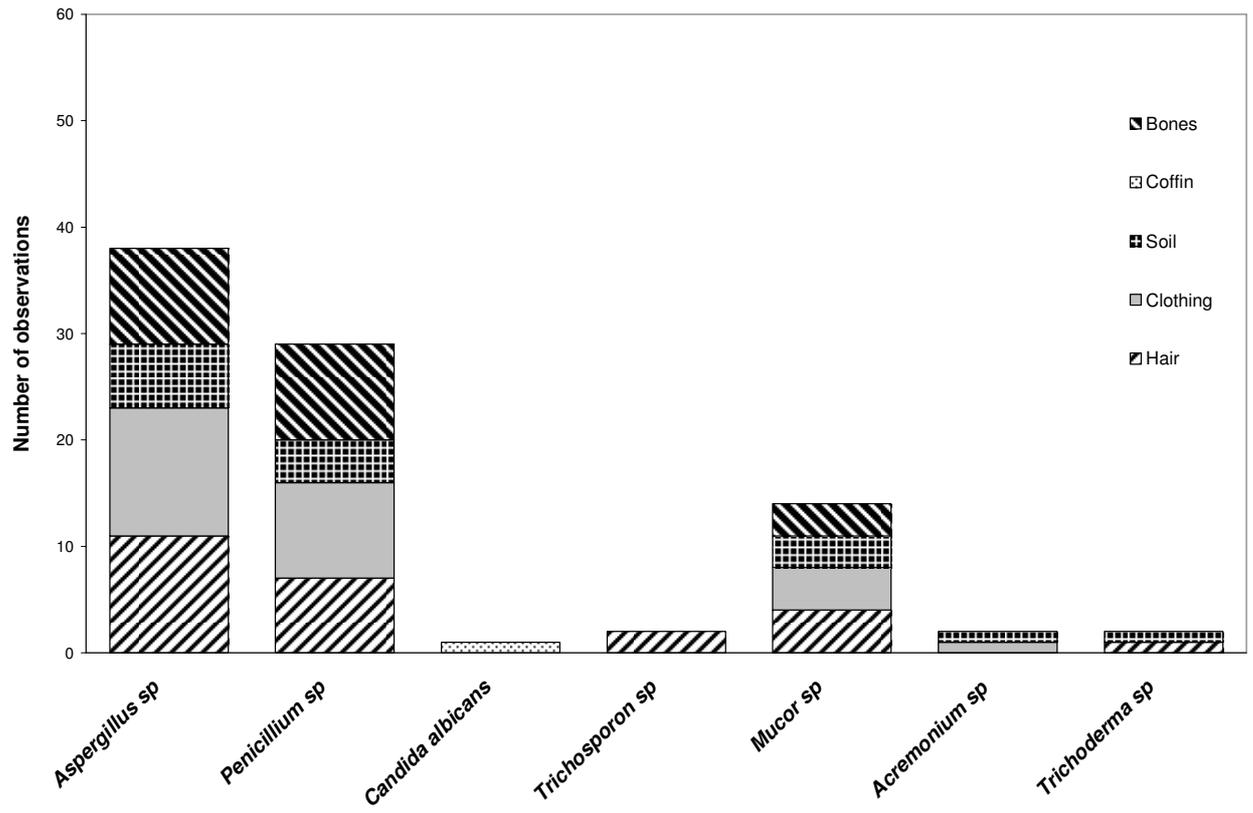


Fig. 3 – Skeletonization Phase and Fungal Genera Isolated