

Tábata Burkhardt Rodrigues

**AVALIAÇÃO DA SUCESSÃO FÚNGICA EM CARCAÇA DE
SUÍNO (*Sus scrofa* L.) PARA A DETERMINAÇÃO DE
INTERVALO *POST MORTEM***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Dr. Admir José
Giachini

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rodrigues, Tábata Burkhardt

Avaliação da sucessão fúngica em carcaça de suíno (*Sus scrofa* L.) para a determinação de intervalo post mortem / Tábata Burkhardt Rodrigues ; orientador, Admir José Giachini - Florianópolis, SC, 2014.

57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Micologia Forense. 3. Intervalo post mortem. I. Giachini, Admir José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Tábata Burkhardt Rodrigues

**AVALIAÇÃO DA SUCESSÃO FÚNGICA EM CARÇA DE
SUÍNO (*Sus scrofa* L.) PARA A DETERMINAÇÃO DE
INTERVALO *POST MORTEM***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado em sua forma final para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora:

Dr. Admir José Giachini - membro
Orientador
Depto. MIP/CCB/UFSC

Dr. Carlos José de Carvalho Pinto - membro
Depto. MIP/CCB/UFSC

Dr. Rafael Dutra de Armas - membro
Depto. MIP/CCB/UFSC

Dedico à minha mãe e ao meu marido,
meus grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me acompanhado e dado força durante toda a graduação, me ajudando a chegar até aqui.

À minha mãe querida, Christine, que sempre me apoiou e me incentivou nos estudos. Obrigada mãe, pois foi através do seu amor, carinho e disciplina que o meu caráter foi moldado. Você é a grande responsável por eu ter me tornado o que sou hoje.

À Ci, minha mana querida, que também esteve sempre ao meu lado me incentivando e dando suporte em tudo o que eu precisava.

Ao Jônatas, meu marido, pelo companheirismo, amizade, carinho e amor. Sem você não sei como teria conseguido superar os dias mais difíceis. Obrigada por me ajudar sempre, inclusive nas tarefas do curso, e por alegrar os meus dias, e torná-los sempre mais interessantes e felizes.

Ao meu grande *partner* de laboratório Gustavo, que sempre me acompanhou e ajudou nas tarefas de lab e de aula, emprestando um pouquinho de sua memória fantástica e inteligência, tentando me ajudar a ser uma aluna um pouquinho mais avançada. Por sua disposição e talento de marceneiro, que eu desconhecia, colocados em prática para transformar um esqueleto de madeira em uma linda gaiola para minha *pig*.

Às minhas amigas queridas Laura e Gabi, por serem super parceiras e tão “caxias” quanto eu nas tarefas de aula, procurando sempre fazer o melhor e se estressando além da conta com apresentações de trabalhos e provas de fim de semestre. Obrigada pela parceria e amizade.

Aos meus queridos amigos da turma 2009/1, principalmente àqueles com quem mais me diverti, me alegrei, me estressei, me irritei e acabei aprendendo a gostar de montão, meus “irrelevantes” preferidos. Obrigada também pelos piqueniques mil.

Ao professor Admir, por aceitar este desafio de se aventurar pelo mundo desconhecido da Micologia Forense. Por suas orientações, por estar sempre disposto a ajudar e por compartilhar todo seu conhecimento a respeito do maravilhoso mundo da Microbiologia.

À Sara querida, que sem hesitar e tão prestativamente aceitou meu pedido de ajuda e trabalhou com afinco na identificação das leveduras. Nunca irei esquecer tamanho gesto de generosidade.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse desenvolvido. Aos queridos Jason e Ivana, que possibilitaram o transporte da minha gaiola até a UCAD. À Nete, prima

querida, que ajudou numa busca incansável pelo porquinho, lá em Paulo Lopes. Ao Junior e o pessoal da Prefeitura Universitária que toparam ajudar, construindo o esqueleto de madeira da gaiola. À professora Aldaléa Sprada Tavares por autorizar a realização do experimento na UCAD.

À porquinha Clarice (que já estava jurada de morte), por morrer por um objetivo nobre, e fazer parte deste trabalho como peça fundamental.

À galera dos Laboratórios de Microbiologia que esteve sempre à disposição para ajudar, me apoiando e auxiliando em tudo o que precisava. Ao Douglas pelas orientações e ajuda com as culturas e dúvidas mil. Ao David, querido, por ajudar com todo seu conhecimento sobre a micromorfologia dos fungos. À Bianca, fofa, por todo seu incentivo, por se colocar à disposição sempre e pelo seu alto astral sempre contagiante.

A todos os professores da biologia da UFSC que tiveram um papel super importante na minha formação acadêmica e profissional. Obrigada pelas aulas, palestras, conversas, discussões, brincadeiras e bate-papos. Todo esse aprendizado que adquiri levarei comigo sempre, pela minha vida... vida de bióloga!

Eu, filho do carbono e do amoníaco,
Monstro de escuridão e rutilância,
Sofro, desde a epigênese da infância,
A influência má dos signos do zodíaco.

Profundissimamente hipocondríaco,
Este ambiente me causa repugnância...
Sobe-me à boca uma ânsia análoga à ânsia
Que se escapa da boca de um cardíaco.

Já o verme — este operário das ruínas —
Que o sangue podre das carnificinas
Come, e à vida em geral declara guerra,

Anda a espreitar meus olhos para roê-los,
E há de deixar-me apenas os cabelos,
Na frialdade inorgânica da terra!

(Augusto dos Anjos)

RESUMO

A Medicina Legal tem utilizado diferentes ferramentas capazes de auxiliar na determinação do intervalo *post mortem* (IPM). No entanto, as ferramentas utilizadas comumente pelos peritos, nem sempre são suficientes na determinação do IPM. Dessa forma, a utilização da Micologia Forense surge como uma alternativa complementar atrativa e importante, dado que os fungos são organismos saprófitos, estando comumente associados a corpos em decomposição, oferecendo à Medicina Legal, portanto, informações relevantes a respeito da cronologia do processo cadavérico. Contudo, a escassa literatura científica tem dificultado sua consolidação como ciência praticada no meio pericial. Diante disso, este trabalho pretende subsidiar a utilização da Micologia Forense para esses fins, através do levantamento das espécies fúngicas presentes em cadáver de suíno (*Sus scrofa* L.), correlacionando-as com o IPM. Para tal, a carcaça de um suíno de 20 kg foi colocada para decompor em uma gaiola, no período de verão, em um fragmento de Mata Atlântica, na Unidade de Conservação Desterro, situada em Florianópolis, Santa Catarina. Durante os 57 dias de acompanhamento da decomposição foram realizadas 29 coletas na pele e mucosas oral e anal do suíno. Dados de temperatura ambiente, do solo, do suíno e umidade relativa do ar foram obtidos nas coletas. Foram identificados cinco estágios de decomposição do suíno. Um total de treze espécies de fungos foi identificado até o menor táxon possível ao longo do IPM. Os fungos leveduriformes, representados pelos gêneros *Arthrographis*, *Candida* e *Rhodotorula*, foram mais diversos e predominaram nos três primeiros estágios da decomposição, totalizando cinco espécies no primeiro estágio, seis no segundo e cinco no terceiro. Os filamentosos, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Mucor* e *Scedosporium*, foram mais diversos e predominantes no quarto estágio de decomposição, totalizando cinco espécies. Um dos principais resultados foi a presença de certas espécies de fungos ocorrendo em estágios únicos de decomposição da carcaça suína, tais como a levedura *Candida zeylanoides* e os fungos filamentosos *Acremonium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* ocorrendo somente na pele durante o estágio fermentativo. Outros como o gênero *Curvularia* foram encontrados também somente na pele, mas durante a putrefação escura. Embora este estudo tenha revelado importantes contribuições com a Micologia Forense, como o padrão de distribuição dos fungos durante os estágios, bem como espécies que se mostraram potenciais marcadores do IPM, a sucessão fúngica em cadáveres ainda não oferece função efetiva de

marcador biológico que permita, com segurança, demonstrar a relação fungo-intervalo *post mortem*.

Palavras-chave: Medicina Legal; Decomposição; Cronologia de Morte; Micologia Forense.

ABSTRACT

The Legal Medicine has used different tools that can help determine the *post mortem* interval (PMI). However, the tools commonly used by the experts are not always sufficient to determine the PMI. Thus, the use of Forensic Mycology emerges as an attractive and important complementary alternative, because fungi are saprophytic organisms and is commonly associated with decomposing bodies, offering Forensic Medicine, therefore, relevant information about the chronology of cadaveric process. However, scant literature has hampered its consolidation as science practiced in the forensic field. Thus, this paper aims to support the use of Forensic Mycology for these purposes by the lifting of the fungical species present in cadaver pig (*Sus scrofa* L.) and their correlation with PMI. For such, the carcass of a pig 20 kg was left to decompose inside a cage, in the summer, in a fragment of Atlantic Forest, at Desterro Conservation Unit, located in Florianópolis, Santa Catarina. During the 57 days of monitoring the decomposition 29 collections on the skin and mucous membranes of the oral and anal pig were performed. Temperature data from environment, soil, pig and relative humidity were obtained from the collections. Five stages of decomposition of the pig were identified. A total of thirteen species of fungi were identified to the lowest possible taxon along the PMI. The Yeasts, represented by the genera *Arthrographis*, *Candida* and *Rhodotorula*, were more diverse and predominated in the first three stages of decomposition, totaling five species in the first stage, six in the second and five in the third. Filamentous, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Mucor* and *Scedosporium* were more diverse and predominated in the fourth stage of decomposition, totaling five species. A key finding was the presence of certain species of fungi occurring in single stages of decomposition of swine carcass, such as the yeast *Candida zeylanoides* and filaments fungi *Acremonium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* occurring only in the skin during the fermentation stage. Others as *Curvularia* genera were also found only in the skin, but during the dark putrefaction. Although this study revealed important contributions to the Forensic Mycology, as the pattern of distribution of fungi during stages, as well the species which showed potential markers of PMI, the fungical succession on corpses still offers no effective function biomarker that permits, safely, demonstrate the relationship fungus-*post mortem* interval.

Keywords: Legal Medicine; Decomposition; Chronology of Death; Forensic Mycology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da Ilha de Santa Catarina (A), destacando a Unidade de Conservação Desterro (B), a sede da unidade (C) e o local do experimento (D).	29
Figura 2. Gaiola, construída em madeira e tela metálica, utilizada para proteção do suíno depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.....	31
Figura 3. Esquema do regime de plaqueamento utilizado para identificar isolados de culturas fúngicas, coletados de carcaça de suíno depositada na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.....	33
Figura 4. Cultura de <i>Curvularia</i> sp. em meio de cultura MEA (A), isolada de carcaça de suíno instalada na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina, e sua micromorfologia à microscopia óptica em aumento de 40X (B).....	34
Figura 5. Culturas em meio CHROMagar de (A) de <i>C. krusei</i> e (B) <i>C. tropicalis</i> , isoladas de carcaça de suíno, instalada na Unidade Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.....	35
Figura 6. Micromorfologia de <i>Candida tropicalis</i> em ágar fubá – Tween 80, isolada de carcaça de suíno, instalada Unidade Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.....	36
Figura 7. Cinco estágios de decomposição observados no suíno, depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina: (A) Inicial, (B) Putrefação, (C) Putrefação escura, (D) Fermentação butírica, (E) Seco.	37
Figura 8. Gráfico com dados de temperatura registrados no local do experimento, no período de amostragem e número de espécies fúngicas encontradas em cada dia de amostragem.	40
Figura 9. Gráfico com dados de precipitação fornecidos por EPAGRI/CIRAM e umidade relativa do ar registrada no local do experimento no período de amostragem.....	41
Figura 10. Análise de correlação de Pearson entre o número de espécies fúngicas encontradas no ânus do suíno e a temperatura ambiente medida no local do experimento. (*) Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Duração dos diferentes estágios de decomposição observados no suíno depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.	38
Tabela 2. Relação das espécies fúngicas encontradas em cada um dos sítios de coleta nos cinco estágios de decomposição do suíno depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. MEDICINA LEGAL	21
1.2. TANATOLOGIA	21
1.3. ESTÁGIOS DE DECOMPOSIÇÃO	22
1.4. INTERVALO <i>POST MORTEM</i>	23
1.5. MICOLOGIA FORENSE.....	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. METODOLOGIA	29
3.1. ÁREA DE ESTUDO	29
3.2. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO	30
3.3. COLETA DE DADOS.....	31
3.4. COLETA DE AMOSTRAS.....	31
3.5. PROCEDIMENTO LABORATORIAL	32
3.5.1. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	32
3.5.2. IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	34
4. RESULTADOS	37
4.1. ESTÁGIOS DE DECOMPOSIÇÃO	37
4.2. COMPOSIÇÃO FÚNGICA	38
4.3. DADOS ABIÓTICOS	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEDICINA LEGAL

A Medicina Legal é uma ciência de característica multifacetada, pois faz uso de um conjunto amplo de diferentes ramos da Medicina a serviço das Ciências Jurídicas e Sociais. No ramo da Medicina relaciona-se com praticamente todas as especialidades, dentre elas a Psiquiatria, a Patologia, a Traumatologia, a Neurologia, a Obstetrícia e Ginecologia, a Microbiologia, a Entomologia e a Toxicologia (FRANÇA, 1998). Por estar relacionada com uma extensa gama de outras ciências e por percorrer vasto raio de atividades, a Medicina Legal torna-se de difícil precisão quanto a sua conceituação. Gomes (1998) cita em seu livro a visão de um grande e conceituado médico legista austríaco, chamado Hoffman, que explana seu entendimento a respeito da Medicina Legal e a caracteriza como uma ciência que tem por objeto o estudo das questões no exercício da jurisprudência civil e criminal e cuja solução depende de certos conhecimentos médicos prévios. Contudo, conhecer tais conceitos não é mais importante que entender sua real e extraordinária importância. A Medicina Legal não existe apenas para que os interesses da coletividade sejam cumpridos, mas também para que através de sua aplicação a ordem pública e social seja alcançada (FRANÇA, 1998).

1.2. TANATOLOGIA

Dentro do contexto das muitas áreas que se coadunam para embasar a Medicina Legal, tais como Antropologia, Traumatologia, Sexologia, Toxicologia, Asfisiologia, Psicologia, Psiquiatria, Criminalística, Criminologia, Infortunística, Genética e Vitimologia está a Tanatologia Médico-Legal. Este campo é importantíssimo e se ocupa em analisar a morte e suas atribuições legais. A Tanatologia aborda os mais diferentes conceitos sobre a morte, analisa os direitos sobre o cadáver, o diagnóstico de morte, o tempo aproximado da morte, a morte súbita, a morte agônica, a necropsia médico-legal, a exumação e o embalsamento, enfim, a Tanatologia cuida tanto da morte, como do morto (FRANÇA, 1998).

A morte, como atualmente estabelece o Conselho Federal de Medicina (Resolução CFM, nº 1.480/97), pode ser definida quando há um quadro de parada total e irreversível das atividades encefálicas, ou seja, morte encefálica. Tradicionalmente definia-se a morte como a

cessação total e permanente das funções vitais, ou seja, algo pontual, momentâneo. Atualmente, defende-se a ideia de que a morte não é apenas um momento, mas sim uma série de processos que são desencadeados e que decorrem por um período de tempo (SANTOS, 2003). Assim, o processo de morte se inicia nos centros vitais cerebrais, ou cardíacos, e se propaga progressivamente para todos os órgãos e tecidos, dando lugar ao aparecimento de um conjunto de fenômenos ditos cadavéricos, ou *post mortem*. Estes são comumente classificados em dois grupos, os fenômenos de ordem física, ou abióticos, e os de ordem química, ou transformativos. Os fenômenos físicos compreendem a desidratação, o resfriamento do corpo, os livores ou manchas hipostáticas e a rigidez cadavérica. Os fenômenos de ordem química podem ser subdivididos em dois grupos, os destrutivos, que compreendem a autólise e a putrefação, e os conservadores, compreendidos pela mumificação, saponificação e corificação (GOMES, 1998; SANTOS, 2003).

1.3. ESTÁGIOS DE DECOMPOSIÇÃO

A putrefação, fenômeno transformativo de grande relevância para as análises periciais, é comumente dividida em estágios ou fases. A nomenclatura, assim como a quantidade total de fases podem variar de autor para autor, podendo ser classificada em quatro, cinco e até seis estágios (CARTER *et al.*, 2007). Bornemissza (1957) em seu estudo, utilizando porco-da-índia como modelo animal, observou e classificou em cinco os estágios de decomposição: inicial (fresco), putrefação, putrefação escura, fermentação butírica e seco. No estágio inicial, a carcaça tem aspecto fresco externamente, mas apresenta decomposição internamente pela atividade das bactérias, e provavelmente também por protozoários e nematódeos presentes no animal antes de sua morte. No estágio de putrefação a carcaça se encontra inchada pelo acúmulo de gases produzidos internamente, por bactérias como *Escherichia coli* e outras, que se multiplicam e atacam o sangue e os intestinos, afetando depois outros órgãos do animal (HAGLUND; SORG, 1996). O odor de decomposição é aparente. No estágio de putrefação escura, o corpo inchado se rompe, por conta do escape dos gases, havendo exposição de tecidos escuros, de consistência cremosa, e o odor de putrefação torna-se muito intenso. No estágio de fermentação butírica, a carcaça seca por fora, apresentando ainda alguns tecidos remanescentes e um odor característico de queijo provocado pela presença do ácido butírico. Na superfície ventral se desenvolvem fungos, sugerindo a ocorrência de

processos fermentativos. No estágio seco, última fase, a velocidade de decomposição diminui, fazendo com que carcaça quase seca seja decomposta muito lentamente, até restarem apenas os ossos. (BORNEMISSZA, 1957).

Diversos são os fatores que agem em diferentes estágios de putrefação, influenciando na marcha da decomposição cadavérica. Alguns fatores são ditos intrínsecos, quando estão relacionados ao corpo, tais como idade, constituição e causa da morte. A decomposição ocorre mais rapidamente nos recém-nascidos e nas crianças do que nos adultos (FRANÇA, 1998). Indivíduos obesos decompõem de maneira mais rápida devido a maior quantidade de líquidos nos tecidos, o que facilita a maior propagação das bactérias. Vítimas de graves infecções e grandes mutilações decompõem mais rapidamente, devido a maior difusão bacteriana (MARQUES, 2008). Os fatores ditos extrínsecos são aqueles que estão relacionados ao ambiente externo, como a temperatura, a aeração e a umidade do ar. Assim, ambientes com temperaturas em torno de 25 e 35 °C são ótimos para o desenvolvimento de bactérias, facilitando a decomposição. Ambientes secos e de fortes ventilações desidratam mais rapidamente os corpos, podendo levar a mumificação. Ambientes muito úmidos retardam a decomposição, levando o cadáver à saponificação (MARQUES, 2008).

1.4. INTERVALO *POST MORTEM*

O conhecimento de todos os fenômenos cadavéricos é de grande importância para as análises periciais de uma investigação criminal, principalmente quando se objetiva conhecer o intervalo *post mortem* (IPM). O IPM, ou diagnóstico cronológico da morte, também conhecido como Cronotanatognose, busca estimar o espaço de tempo decorrido do óbito até o achado pericial. Para tal, a Cronotanatognose incorpora técnicas e análises provenientes de outros ramos de pesquisa, tais como a Arqueologia, Química, Botânica, Ecologia, Entomologia e Microbiologia de solos com o intuito de analisar com maior acurácia os processos de degradação cadavérica (CARTER; TIBBETT, 2003).

Para que a perícia médico-legal chegue à solução de indagações concernentes ao tempo de morte é necessário que sejam utilizadas o maior número de ferramentas possíveis, que corroborem suas conclusões, já que o esclarecimento de tais fatos é de extrema importância nos processos judiciais. Infelizmente, as técnicas utilizadas mais comumente pelos peritos, baseadas nos fenômenos cadavéricos, como rigidez, livores, resfriamento, putrefação, entre outros, podem não

apresentar total eficácia devido a certos fatores, como os intrínsecos e extrínsecos, abordados anteriormente, que acabam por influenciar tais processos (OLIVEIRA-COSTA, 2008).

Uma ferramenta que tem sido bastante difundida, principalmente em países do hemisfério norte, é a que faz uso da Entomologia Forense (OLIVEIRA-COSTA, 2008). Essa ciência aplica o conhecimento acerca da biologia e comportamento de insetos, e outros artrópodes, associados aos processos de degradação cadavérica, com o propósito de fornecer informações às investigações criminais, inclusive aquelas relacionadas ao IPM (BYRD; CASTNER, 2010). Contudo, a análise da sucessão de insetos em cadáveres, em alguns casos, também pode apresentar ineficiência, principalmente nas fases muito avançadas da decomposição, em que o substrato orgânico é reduzido ou quando o cadáver se encontra em um ambiente não propício a colonização de insetos (HITOSUGI *et al.*, 2006). Diante de cenários assim é que se percebe a necessidade de se utilizar outras técnicas que possibilitem a caracterização do IPM, ou que auxiliem as técnicas já utilizadas, reforçando suas conclusões. Com base nesse exposto é que pesquisas têm sido feitas com o intuito de fortalecer ciências importantes como a Micologia Forense, para torná-la uma ferramenta utilitária nas práticas periciais.

1.5. MICOLOGIA FORENSE

A Micologia Forense é um dos ramos que integram a Microbiologia Forense e se ocupa em estudar as espécies fúngicas que estão relacionadas aos processos de decomposição cadavérica, que apresentam, portanto, relevância para aplicação da Medicina Legal. É uma ciência considerada relativamente nova, tendo seu primeiro artigo de revisão publicado apenas em 2003 (CARTER; TIBBETT, 2003).

As aplicações dos fungos nas análises forenses são variadas e não se restringem apenas à determinação do tempo de morte, incluem papéis como: fornecer evidências residuais; determinar o tempo de deposição; investigar causa de morte, alucinações ou envenenamentos; localizar cadáveres enterrados e guerra biológica (HAWKSWORTH; WILTSHIRE, 2011).

Os primeiros pesquisadores que tiveram interesse em analisar se o crescimento fúngico em cadáver tinha valor na determinação do tempo de morte foram os belgas Voorde e van Dijck (VOORDE; VAN DIJCK, 1982). Naquele trabalho, os pesquisadores isolaram os fungos que cresciam sobre as pálpebras e na pele inguinal de uma baronesa que

havia sido assassinada e encontrada morta em seu quarto, em uma antiga mansão na Bélgica, no ano de 1980. Os fungos isolados foram incubados sob mesma temperatura em que o corpo foi encontrado, a uma constante de 12 °C, como nos registros do termostato presente no quarto. Através das medições diárias do crescimento das colônias fúngicas, pode-se estimar a morte da baronesa em aproximadamente 18 dias antes de seu corpo ser encontrado, o que coincidiu exatamente com a informação dada pelo assassino quando admitiu tê-la matado.

Noutro trabalho, Hitosugi *et al.* (2006) também demonstraram a importância da utilização dos fungos para determinação do IPM. Estes pesquisadores isolaram e identificaram os fungos que colonizavam a face de um homem encontrado morto, em posição ajoelhada, com parte do corpo imerso na água, no fundo de um poço. Com os dados da colonização fúngica, juntamente com dados da aparência da superfície do cadáver, do estado de decomposição de seus órgãos e informações policiais que indicavam seu desaparecimento por volta de 12 dias, pode-se estimar que a morte do homem ocorrera há pelo menos 10 dias. Neste caso a Entomologia Forense não pode auxiliar como ferramenta para determinação do tempo de morte, pelo fato de não haver colonização de insetos no cadáver, por isso a Micologia Forense foi ferramenta imprescindível no auxílio da determinação do IPM.

Embora os fungos sejam organismos cosmopolitas e ubíquos, ou seja, ocorrem em praticamente todo o globo e em quase todo tipo de ambiente/substrato, a sua utilização pela Ciência Forense tem sido pouco relevante. Talvez esse cenário seja um reflexo da falta de levantamento de informações quanto à composição e diversidade fúngica em regiões pouco exploradas como restinga, caatinga, desertos, trópicos entre outros (SILVA; MINTER, 1995), ou ainda por falta de mais estudos específicos na área de Micologia Forense. Hawksworth e Wiltshire (2011) ressaltam que existem ainda poucos dados precisos sobre o crescimento fúngico em tecidos humanos em decomposição, especialmente sob diferentes condições de temperatura e umidade. Menezes (2007) complementa que pesquisas utilizando modelos que substituam os exemplares humanos devem ser exploradas, para facilitar a sua dinâmica e assim poder fundamentar cada vez mais a utilização do conhecimento a respeito do crescimento fúngico em cadáveres em decomposição, como uma ferramenta forense.

Neste contexto, estudos tanatológicos tem procurado utilizar, regularmente, animais como modelos análogos a humanos para estimar os processos de decomposição que um cadáver sofreria em condições ambientais específicas. Isso ocorre devido a pouca disponibilidade de

cadáveres humanos para tais fins e ainda pelas implicações éticas e culturais que estão relacionadas à sua utilização, gerando, portanto, certa restrição (STOKES *et al.*, 2013). Dentre os mamíferos, o modelo animal mais comumente utilizado em análises de decomposição cadavérica é o suíno, devido à sua semelhança anatômica interna aos humanos, como tamanho relativo dos órgãos e proporção da cavidade torácica, e também a distribuição de gordura, a quantidade de pelos e a sua dieta onívora (SCHOENLY *et al.*, 2006; BYRD; CASTNER, 2010). Segundo Campobasso *et al.* (2001) a microbiota intestinal e a pele dos suínos também se assemelham muito as dos humanos e os processos de putrefação ocorrem aproximadamente na mesma proporção que em um corpo humano de mesmo peso, corroborando, portanto, o fato do seu emprego como modelo em estudos que buscam analisar a decomposição cadavérica associada ao IPM.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a comunidade fúngica em carcaça de suíno (*Sus scrofa* L.) para a determinação de intervalo *post mortem*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

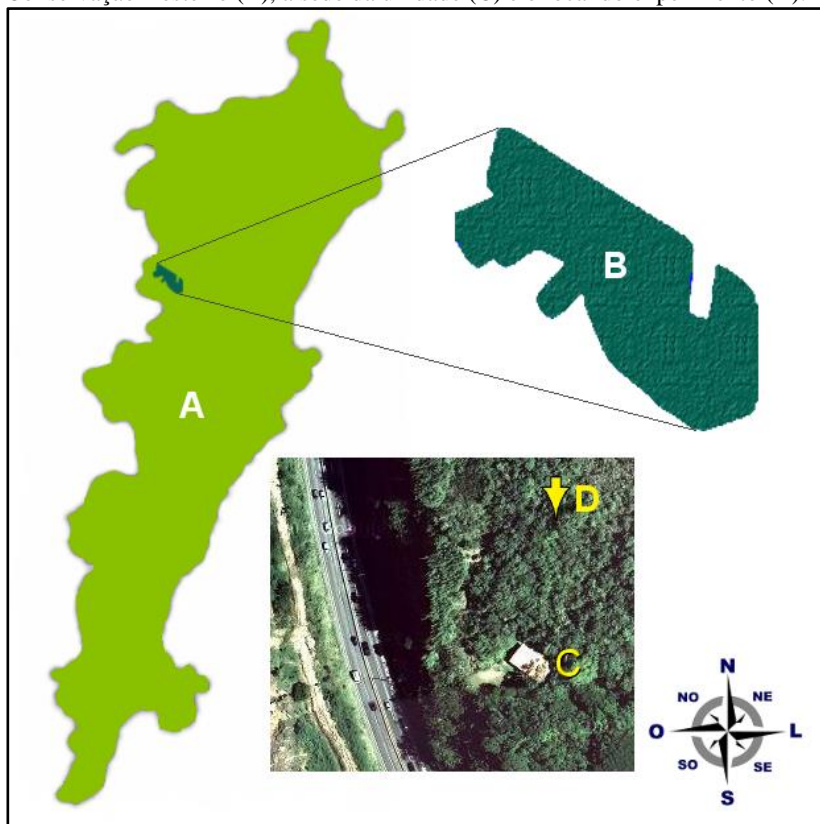
- Identificar as espécies fúngicas associadas a cadáver de suíno em ambiente de Mata Atlântica no estado de Santa Catarina;
- Fornecer uma lista de espécies fúngicas associadas a cadáver de suíno em ambiente de Mata Atlântica;
- Verificar os diferentes estágios de decomposição, seu tempo de duração, relacionando-os às espécies fúngicas identificadas;
- Determinar a presença de fungos em três locais do corpo do suíno e aventar sobre sua relação com o IPM;
- Contribuir para o conhecimento da diversidade fúngica relacionada à decomposição cadavérica e determinação de IPM, incentivando o desenvolvimento de estudos em Micologia Forense.

3. METODOLOGIA

3.1. ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na Unidade de Conservação Ambiental Desterro (UCAD), situada na região noroeste de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (Figura 1), em uma área próxima à sede, sob as coordenadas $27^{\circ}31'51''$ S e $48^{\circ}30'45''$ W, a uma altitude de 57 m.

Figura 1. Mapa da Ilha de Santa Catarina (A), destacando a Unidade de Conservação Desterro (B), a sede da unidade (C) e o local do experimento (D).



A UCAD é um espaço natural protegido adquirido em 1996 pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com o apoio do governo do Estado e tem por objetivo promover projetos integrados de

pesquisa que contemplem diferentes áreas do conhecimento (CECCA, 1997). Possui uma área total de 491,5 ha, aproximadamente 1,1 % do território de Florianópolis, e apresenta vegetação do tipo Floresta Ombrófila Densa em quatro diferentes estádios de regeneração: capoeirinha (cerca de seis anos de regeneração), capoeira (aproximadamente vinte anos de regeneração), capoeirão (em torno de 30 anos de regeneração) e floresta secundária (exploração seletiva, sem cortes rasos da vegetação) (BONNET; QUEIROZ, 2006).

Segundo a classificação climática de Köppen o clima da região é do tipo Cfa (mesotérmico úmido, com verões quentes e chuvas distribuídas durante o ano) com temperatura média anual de 21,15 °C, média mensal no verão de 23,46 °C e 16,75 °C de média mensal para os meses de inverno. A umidade relativa do ar é alta, em torno de 80 %, com chuvas bem distribuídas durante o ano todo, não havendo estação seca ou chuvosa (PORTO FILHO, 1993).

3.2. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO

Para o experimento foi utilizado um porco doméstico (*Sus scrofa* L.) pesando 20 Kg, adquirido já morto de um criadouro/abatedouro do município de Paulo Lopes, na região da Grande Florianópolis, estado de Santa Catarina. O animal foi abatido por golpe de martelo na face frontal do crânio e levado ao local do experimento no mesmo dia, onde foi posicionado dentro de uma gaiola, em contato direto com o solo. A gaiola possuía dimensões de 110 x 70 x 70 cm e foi revestida com tela metálica (Figura 2), para permitir a passagem da entomofauna cadavérica e impedir o acesso de animais necrófagos de grande porte que pudessem comprometer o experimento. A gaiola possuía dobradiças num dos lados da tampa superior, permitindo sua abertura e acesso total ao animal para realização das coletas.

Figura 2. Gaiola, construída em madeira e tela metálica, utilizada para proteção do suíno depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.



3.3. COLETA DE DADOS

Para este trabalho foi realizado um total de 29 coletas. Até o 30º dia de decomposição do suíno, as coletas seguiram um regime aproximadamente diário, que ocorreu no período de 23 de janeiro a 21 de fevereiro de 2013. Durante este intervalo não foram realizadas coletas no 7º, 12º, 17º, 21º e 27º dia de decomposição. Do dia 21 de fevereiro ao dia 20 de março foram realizadas mais quatro coletas, sendo duas com intervalos de cinco dias, uma com seis e a última com onze dias de intervalo entre uma coleta e outra.

As coletas foram realizadas no período da manhã, respeitando-se sempre o horário pré-determinado entre as 9 e às 9h30min.

No local do experimento, em cada uma das 29 coletas de material biológico, com o auxílio de um termo-higrômetro, foram coletados dados de temperatura do ambiente, do solo e das mucosas oral e anal, bem como dados da umidade relativa do ar.

Dados meteorológicos de precipitação foram disponibilizados pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (EPAGRI/CIRAM), tendo sido coletados na estação meteorológica mais próxima ao local do experimento, localizada no bairro Itacorubi, sob as coordenadas 27°38'50" S e 48°30' W, a uma altitude de 2 m.

3.4. COLETA DE AMOSTRAS

As coletas das amostras de material biológico foram realizadas com auxílio de *swabs* estéreis, através de movimentos de fricção nas

regiões de mucosa oral, anal e pele do animal. Esses três sítios anatômicos de coleta, comumente analisados em diagnósticos micológicos laboratoriais, foram escolhidos por possuírem maior probabilidade de se evidenciar crescimento fúngico (MOREIRA FILHO, 2008). Em cada uma das regiões foi realizada uma coleta com um *swab*, sendo devidamente identificado e acondicionado em sua própria embalagem estéril, seguindo após isto para realização de culturas no laboratório.

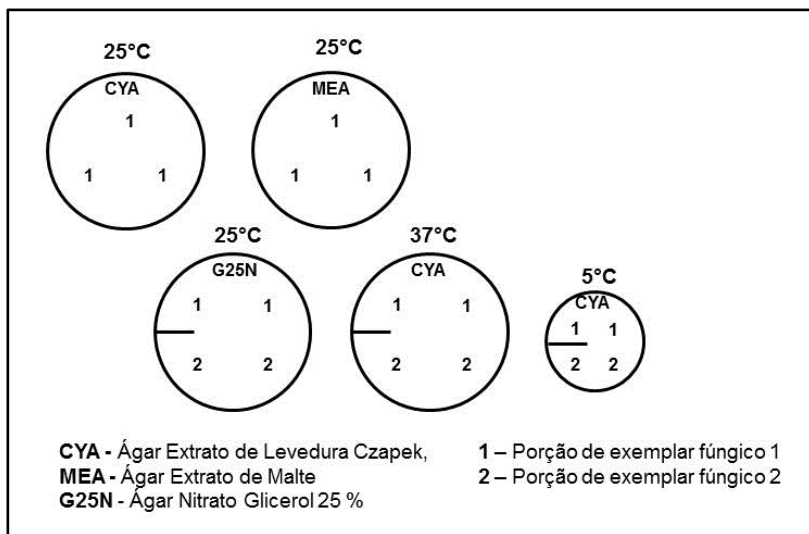
3.5. PROCEDIMENTO LABORATORIAL

Todas as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Diversidade Microbiana, situado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras destinadas ao cultivo foram semeadas através de estrias de esgotamento, em meio de cultura Ágar Sabouraud 2 % de glicose, acrescido de Cloranfenicol (100 mg ml^{-1}). Este meio de cultura basal é comumente utilizado para isolamento primário de fungos, sendo a presença de antibiótico de amplo espectro, como o Cloranfenicol, importante para que o crescimento bacteriano seja inibido, permitindo um melhor crescimento dos fungos (SIDRIM; ROCHA, 2004). As culturas foram incubadas em estufa a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 10 dias.

3.5.1. Identificação dos fungos filamentosos

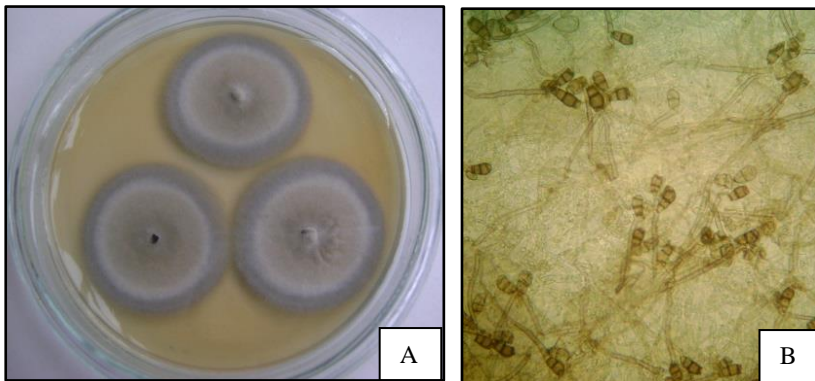
Para a identificação dos fungos filamentosos seguiu-se a metodologia proposta por Pitt e Hocking (2009), que se baseia na utilização de um sistema de plaqueamento seguido de análises do desenvolvimento das colônias crescidas após o período de sete dias e estas comparadas com as informações presentes nas chaves de identificação disponibilizadas pelos autores.

Figura 3. Esquema do regime de plaqueamento utilizado para identificar isolados de culturas fúngicas, coletados de carcaça de suíno depositada na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.



Para isto, os fungos foram cultivados em três diferentes meios de cultura: CYA (Ágar Extrato de Levedura Czapek), MEA (Ágar Extrato de Malte) e G25N (Ágar Nitrato Glicerol 25 %) a três diferentes temperaturas (5 °C, 25 °C e 37 °C). Esse sistema possibilita a identificação simultânea de até dois exemplares fúngicos, permitindo máxima eficiência de tempo, espaço e material. As placas foram inoculadas com pequenas porções de micélio distribuído em três, ou quatro pontos equidistantes sobre a superfície do meio de cultura, conforme demonstrado na Figura 3. Após a inoculação as placas foram incubadas por sete dias em estufas com temperaturas de 25 °C e 37 °C e em refrigerador para a temperatura de 5 °C. No final dos sete dias as placas foram analisadas quanto às informações macroscópicas do tipo, tamanho e coloração das colônias, coloração do reverso da placa, e microscópicas como presença, forma e coloração das estruturas reprodutivas e não reprodutivas dos fungos (conforme exemplo da Figura 4). Os resultados foram sempre comparados com as informações disponíveis nas chaves de identificação propostas por Pitt e Hocking (2009).

Figura 4. Cultura de *Curvularia* sp. em meio de cultura MEA (A), isolada de carcaça de suíno instalada na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina, e sua micromorfologia à microscopia óptica em aumento de 40X (B).



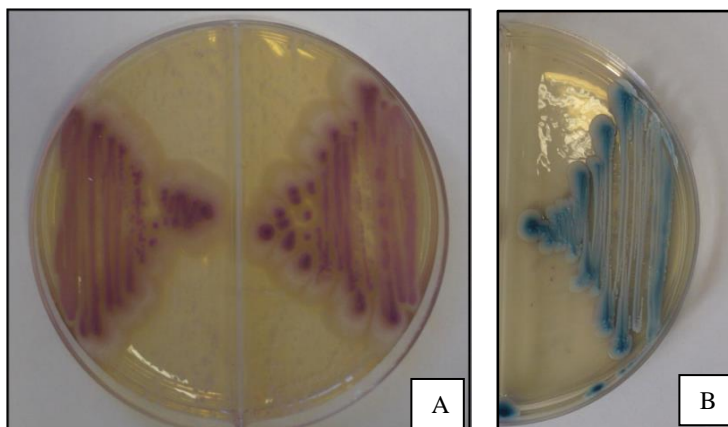
3.5.2. Identificação das leveduras

A identificação das cepas de leveduras foi realizada pela especialista Sara Letícia Kretzer, em parceria com o Laboratório Didático de Micologia Clínica, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFSC.

Num primeiro momento foi realizado um exame direto das cepas de leveduras isoladas das culturas basais. Para isso, foi retirada uma pequena alíquota do material cultivado, montado em lâmina-lamínula com adição de lactofenol azul de algodão, para através da observação em microscópio óptico, confirmar se tratarem de colônias de leveduras.

Após isto, fez-se cultivo das cepas em CHROMagar (Figura 5), um meio de cultura cromogênico que tem como finalidade identificar presuntivamente algumas espécies de levedura, principalmente do gênero *Candida*, bem como de facilitar a detecção de culturas mistas, através de reações enzimáticas espécie-específicas, produzindo coloração nas colônias (BARBEDO; SGARBI, 2010). Esse método proporciona sensibilidade e especificidade que excede 99 % para espécies como *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* que apresentam colônias de coloração verde, rosa-pálido e azul, respectivamente (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Figura 5. Culturas em meio CHROMagar de (A) de *C. krusei* e (B) *C. tropicalis*, isoladas de carcaça de suíno, instalada na Unidade Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.



Fonte: Sara L. Kretzer (2013).

Para o estudo das características micromorfológicas foi utilizada a técnica do microcultivo em meio de ágar fubá acrescido de Tween 80. Essa técnica permite que sejam identificados gêneros, ou mesmo espécies de leveduras através da análise da presença e disposição de estruturas como blastoconídios, artroconídios, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. As leveduras produzem essas estruturas devido ao estímulo gerado pelo meio de cultura e pela baixa tensão de oxigênio (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As amostras das colônias de leveduras foram semeadas em placas de Petri (70 mm de diâmetro) contendo o meio ágar fubá, esgotando-se três estrias paralelas e cobrindo-as, em sua porção central, com uma lamínula esterilizada. Esse método permite realizar até quatro microcultivos de cepas diferentes em cada placa. As placas foram incubadas a 30 °C, por um período de 48 a 96 horas. A leitura foi realizada através da observação das estrias ao microscópio óptico (Figura 6).

Figura 6. Micromorfologia de *Candida tropicalis* em ágar fubá – Tween 80, isolada de carcaça de suíno, instalada na Unidade Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.



Fonte: Sara L. Kretzer (2013).

Para as cepas que não tiveram identificações conclusivas por meio da utilização dos métodos descritos anteriormente foi necessário empregar-se o *kit* de identificação API 20C AUX (BioMérieux), sistema manual que identifica leveduras baseando-se em provas de assimilação de carboidratos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

4. RESULTADOS

4.1. ESTÁGIOS DE DECOMPOSIÇÃO

Foram observados cinco estágios de decomposição no suíno utilizado no experimento (Figura 7): inicial, putrefação, putrefação escura, fermentação butírica e seco. O intervalo de duração de cada estágio está apresentado na Tabela 1.

Figura 7. Cinco estágios de decomposição observados no suíno, depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina: (A) Inicial, (B) Putrefação, (C) Putrefação escura, (D) Fermentação butírica, (E) Seco.

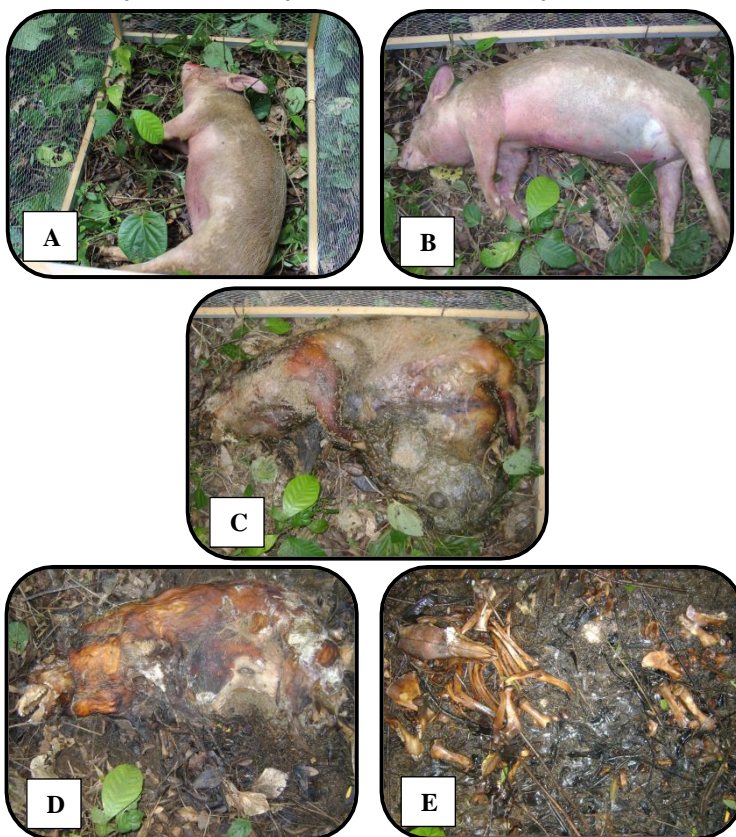


Tabela 1. Duração dos diferentes estágios de decomposição observados no suíno depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.

Estágio de decomposição	Intervalo do estágio	Duração do estágio (em dias)
Inicial	Dia 1	1
Putrefação	Dia 2	1
Putrefação escura	Dia 3 a 7	5
Fermentação	Dia 8 a 45	38
Seco	Dia 46 (analisado até o dia 57)	–

4.2. COMPOSIÇÃO FÚNGICA

Do total de 98 culturas analisadas, obtidas das amostras coletadas durante os 29 dias de coleta, foram identificados até o menor táxon possível um total de 13 fungos. Destes, sete fazem parte do grupo de fungos filamentosos e seis são fungos leveduriformes. Dentre todos os fungos analisados as duas espécies que estiveram presentes em todos os estágios de decomposição foram as leveduras *Arthrographis* sp. e *Candida lipolytica*. A levedura *Candida zeylanoides* foi registrada apenas na pele do suíno em apenas um dos estágios de decomposição: fermentação butírica. O período e o sítio de coleta que apresentaram maior quantidade de espécies foram estágio de fermentação, com 10 espécies, e a pele, com uma média de 4,4 espécies por estágio. A maioria dos fungos filamentosos foi detectada também neste 4º estágio, fermentação butírica, e na pele da carcaça. Os gêneros *Acremonium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* ocorreram somente na pele durante o estágio fermentativo, e o gênero *Curvularia* foi registrado também apenas na pele, mas no estágio de putrefação escura. Já as leveduras foram mais diversas nos três primeiros estágios de decomposição, apresentando um total de 5 espécies no primeiro estágio, 6 espécies no segundo e 5 espécies no terceiro estágio.

Os fungos encontrados em cada um dos cinco estágios de decomposição estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação das espécies fúngicas encontradas em cada um dos sítios de coleta nos cinco estágios de decomposição do suíno depositado na Unidade de Conservação Desterro, Florianópolis, Santa Catarina.

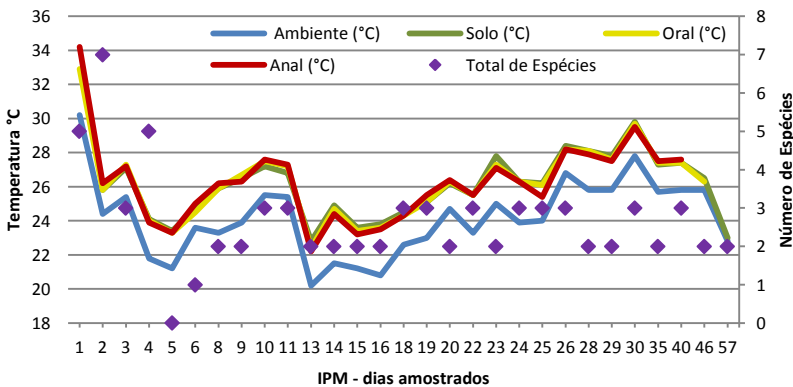
Locais de coleta		Estágios														
		Inicial			Putrefação			Putrefação escura			Fermentação			Seco		
		Boca	Pele	Ânus	Boca	Pele	Ânus	Boca	Pele	Ânus	Boca	Pele	Ânus	Boca	Pele	Ânus
Fungos Leveduriformes	<i>Arthrographis</i> sp.	X	X	X		X	X	X			X	X	X	X	X	X
	<i>Candida guilliermondii</i>	X			X				X							
	<i>Candida krusei</i>				X	X										
	<i>Candida lipolytica</i>	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
	<i>Candida tropicalis</i>		X		X	X		X	X	X	X	X	X			
	<i>Candida zeylanoides</i>											X				
	<i>Rhodotorula</i> sp.			X		X			X							
Fungos Filamentosos	<i>Acremonium</i> sp.										X					
	<i>Aspergillus</i> sp.										X					
	<i>Cladosporium</i> sp.										X					
	<i>Curvularia</i> sp.								X							
	<i>Mucor</i> sp.					X					X		X			
	<i>Scedosporium aurantiacum</i>										X		X			

4.3. DADOS ABIÓTICOS

Durante o experimento a temperatura ambiente mais alta registrada no local foi de 30,2°C, no primeiro dia de amostragem (23 de janeiro), e a mais baixa foi de 20,2°C no 13º dia (04 de fevereiro). A variação da temperatura ambiente ao longo do período de amostragem se mostrou relativamente baixa (Figura 8).

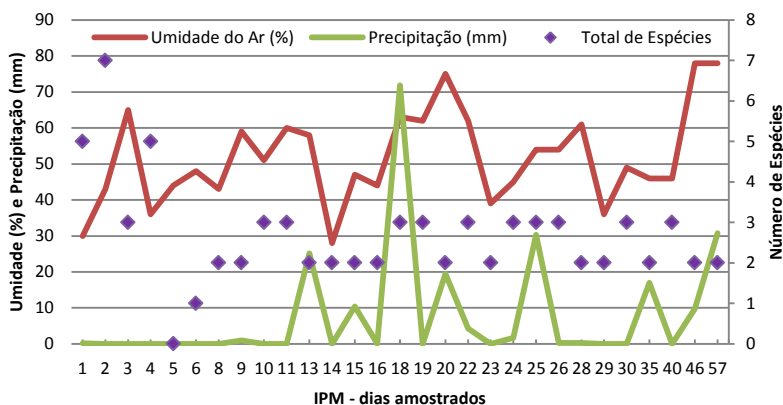
As temperaturas do solo, mucosa oral e anal se mostraram bastante equiparadas entre si e seguiram o mesmo padrão de variação que a temperatura ambiental.

Figura 8. Gráfico com dados de temperatura registrados no local do experimento, no período de amostragem e número de espécies fúngicas encontradas em cada dia de amostragem.



Nos dois últimos dias de amostragem foi registrado o maior valor de umidade relativa do ar, 78%. O menor valor registrado durante o experimento foi de 28%, no 14º dia de amostragem (05 de fevereiro). Para a precipitação a variação foi bastante expressiva. Até o 13º dia de coleta os valores de chuvas foram ínfimos, ficando entre 0 e 1,0 mm. No 18º dia (09 de fevereiro) foi registrado o maior valor de precipitação entre os dias coletados, 71,8 mm de chuva.

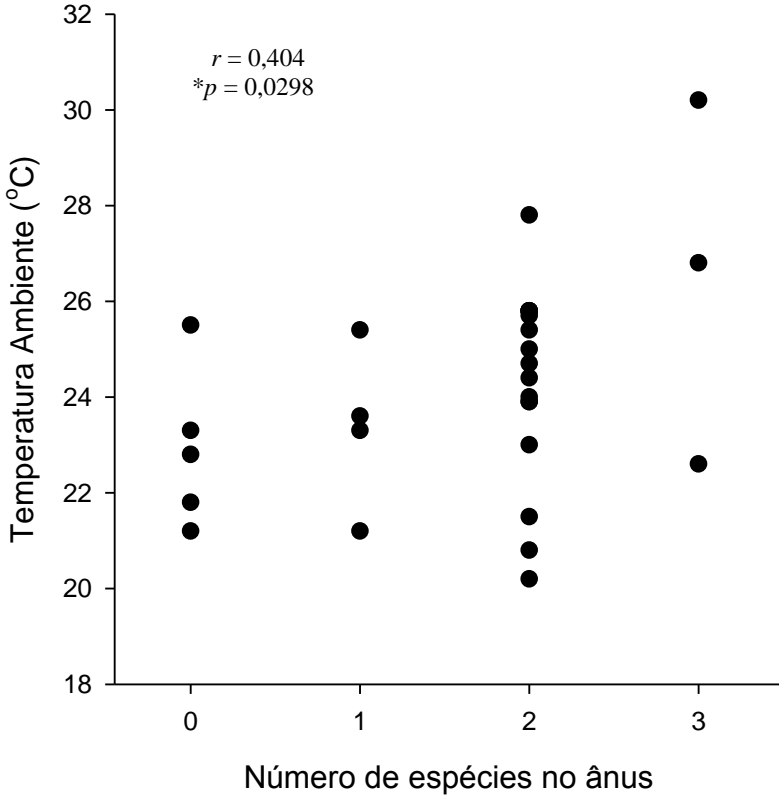
Figura 9. Gráfico com dados de precipitação fornecidos por EPAGRI/CIRAM e umidade relativa do ar registrada no local do experimento no período de amostragem.



Os valores totais de espécies fúngicas registradas em cada um dos dias de coleta estão plotados nos gráficos das Figuras 8 e 9. Quando esses valores são relacionados aos fatores ambientais, como temperatura, umidade e precipitação, o número de espécies não demonstra seguir um padrão resultante de uma correlação tão coadunada.

Entretanto, após a realização de testes estatísticos utilizando-se o *Software* SigmaPlot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc) versão 12.5, para verificar a existência de correlação entre os diferentes dados abióticos e os dados obtidos nas amostragens, notou-se que apenas a correlação entre a temperatura ambiente local e o número de espécies fúngicas encontradas na mucosa anal do suíno obtiveram valores estatísticos significativos segundo a Correlação de Pearson, muito embora este índice seja considerado moderado à baixo. O gráfico apresentado na Figura 10 demonstra essa relação.

Figura 10. Análise de correlação de Pearson entre o número de espécies fúngicas encontradas no ânus do suíno e a temperatura ambiente medida no local do experimento. (*) Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.



5. DISCUSSÃO

Os cinco estágios de decomposição identificados na carcaça do suíno seguiram a classificação de Bornemissza (1957). Para tal, foram utilizadas as fotos tiradas em cada um dos dias de coleta, juntamente com informações levantadas das observações feitas durante as amostragens, para se comparar com as descrições do autor e classificar cada um dos estágios. A divisão dos estágios não é uma tarefa fácil, tornando sua classificação por vezes subjetiva. Autores como Schoenly *et al.* (2006) afirmam que a separação do processo em estágios não deve possuir peso de orientação nas análises, devendo ser considerada apenas indicador de alterações físico-químicas sofridas pelo cadáver, visto que os estágios podem ser inconspícuos. Gunn (2006) ainda ressalta que muitas vezes esses estágios se fundem entre si, tornando difícil sua individualização.

O período de decomposição da carcaça observado neste estudo difere dos resultados obtidos em pesquisas anteriores feitas na região Sul do Brasil, provavelmente em função da variação do tamanho da carcaça e das condições ambientais que são importantes e determinam a duração do processo. Ries (2013), em seu estudo realizado em Viamão, região metropolitana de Porto Alegre, com um suíno de 16 Kg, registrou uma decomposição em 14 dias, ou seja, aproximadamente quatro vezes menor do que o período observado neste experimento para a mesma estação do ano. Neste caso o fator tamanho da carcaça não parece ter influenciado muito no tempo de decomposição, visto que a diferença de peso entre os animais, nos dois estudos, foi de apenas 4 Kg. Embora a classificação climática seja a mesma para Florianópolis e Viamão, a vegetação onde foram realizados os experimentos é diferente. Em Viamão, a pesquisa foi realizada em área de vegetação herbácea, o que permitiu maior exposição solar da carcaça, diferentemente deste experimento, em que o suíno permaneceu em área sombreada de floresta. Esses resultados corroboram a suposição de que as variações locais, que incluem diferenças na composição vegetal, e geográficas, tem valor preponderante de interferência nas comunidades necrófagas, que, por conseguinte, interferem no tempo de decomposição da carcaça (CAMPOBASSO *et al.*, 2001).

Um fator importante levantado por Carvalho e Linhares (2001), que pode ser aplicado para este estudo, é que a decomposição parece ocorrer mais lentamente em áreas de floresta. Campobasso *et al.* (2001) também salienta que ambientes onde a umidade é muito elevada e os tecidos em decomposição ficam ensopados, ocorre uma desaceleração

na marcha cadavérica, podendo em alguns casos convergir para o processo de saponificação (FRANÇA, 1998). Embora os valores de precipitação e umidade do ar obtidos neste trabalho não tenham se mostrado sempre elevados, seus picos em determinados dias, como a precipitação ocorrida no 18º de amostragem, que foi de 78,0 mm de chuva, podem ter possibilitado um microambiente favorável à estagnação do processo de putrefação.

Os números totais de espécies encontradas neste estudo diferem dos resultados encontrados por Goebel *et al.* (2013) num estudo semelhante. Em relação ao número de fungos filamentosos aquele estudo registrou apenas dois representantes, *Penicillium* sp. e *Aspergillus flavus*, enquanto que este experimento resultou num total de seis fungos filamentosos. Um fator importante que pode ter contribuído para o baixo número de achados desse grupo foi o tamanho reduzido de sua amostragem, já que seu número de coletas totalizou apenas cinco, enquanto que para o presente trabalho foram realizadas 29 coletas. No que se refere aos achados de leveduras este estudo também apresentou maior quantidade de espécies, totalizando sete, enquanto Goebel *et al.* (2013), relataram apenas três: *Candida albicans*, *Candida* spp. e uma supostamente do gênero *Trichosporon*. O fato de o presente estudo realizar as identificações até o nível de menor táxon possível pode ter colaborado para um resultado mais expressivo, em se tratando de número de espécies apresentadas, visto que, de um total de sete leveduras cinco pertenciam ao gênero *Candida*.

No que diz respeito aos resultados da sucessão fúngica ocorrida durante a decomposição do suíno pode-se concluir que houve um padrão, embora discreto, de distribuição desses organismos ao decorrer dos estágios de putrefação. Esses resultados diferem dos encontrados por Goebel *et al.* (2013), que não apresentaram distinção na distribuição dos grupos de fungos durante a evolução dos processos cadavéricos. Já Moreira Filho (2008) apresenta resultados semelhantes em suas pesquisas realizadas em corpos humanos em decomposição. Ele relata que os fungos leveduriformes se destacaram mais nos primeiros estágios da decomposição, conforme resultados apresentados neste estudo. No que se refere aos fungos filamentosos seu trabalho se assemelha parcialmente ao presente estudo, visto que ele relata grande prevalência desse grupo tanto no período mais inicial, quanto no período final. Divergindo, no entanto, nos estágios finais da decomposição, já que os achados de fungos filamentosos foram mais representativos no penúltimo estágio de putrefação.

Fungos filamentosos podem facilmente colonizar os restos cadavéricos, onde há pouco substrato disponível, por serem organismos menos fastidiosos do que as leveduras (MOREIRA FILHO, 2008). Todos os seis gêneros filamentosos encontrados neste trabalho podem ser caracterizados como fungos anemófilos, pois são capazes de desenvolver estruturas reprodutivas como esporos e conídios, os quais são veiculados por correntes de ar, fazendo com que sejam dispersos facilmente, com possibilidade de colonizar diferentes ambientes (SOUZA *et al.*, 2008), como por exemplo corpos em decomposição avançada. Além disso, outro fator que corrobora os achados desses fungos no cadáver em decomposição é que alguns desses gêneros são comumente encontrados no solo, como *Acremonium*, que também pode ser encontrado em serapilheira (GHIZELINI *et al.*, 2006), em associação com gramíneas, cipós, outros fungos (ascomicetos) (CLAY, 1993) e insetos (entomopatogênicos) (AZEVEDO, 2000).

Fungos como aqueles do gênero *Aspergillus* representam um grupo amplamente difundido que ocorre com grande frequência em florestas tropicais (CHRISTENSEN; TUTHILL, 1985), comuns em uma ampla variedade de substratos, como madeira, excremento de animais, plumagens, cabelos e eventualmente podendo parasitar plantas e animais (SHARMA, 1989).

Muitos fungos do gênero *Cladosporium* são considerados saprófitos e são facilmente encontrados em plantas e em diversos tipos de detritos, podendo ser isolados também do solo e do ar (CROUS *et al.*, 2007). Da mesma forma o gênero *Curvularia* é conhecido como saprófito em diferentes substratos e algumas espécies podem ser fitopatogênicas em gramíneas de regiões tropicais e subtropicais (SIVANESAN, 1987).

Fungos representantes do gênero *Mucor* também são saprófitos terrestres, podendo se desenvolver em um amplo espectro de substratos como matéria orgânica em decomposição, esterco, detritos vegetais e frutos macerados (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Espécies do gênero *Scedosporium* têm sido amplamente estudadas, nos últimos anos, devido a seu importante valor clínico, pois costumam causar infecções invasivas severas em humanos, principalmente em pacientes imunossuprimidos (TAVARES, 2012). No ambiente esses fungos estão geralmente associados a solos ricos em nutrientes (KALTSEIS *et al.*, 2009). Todas essas características atribuídas aos grupos de fungos filamentosos identificados no experimento ajudam a ratificar os resultados do presente estudo para tais achados.

É importante frisar que apesar dos fungos filamentosos terem se mostrado presentes e relativamente diversos nos resultados deste trabalho, não se pode fazer uma exata correlação desses achados com o que se encontra na literatura especializada. Possivelmente isto ocorre pelo fato dos artigos publicados apresentarem um esforço amostral reduzido, já que são comumente descrições de estudos de caso. Voorde e Van Dijck (1982) na Bélgica, relataram a presença do fungo *Cladosporium* sp., dentre outros achados, na superfície da pele de um cadáver feminino a 18 dias em decomposição.

No Japão, Ishii *et al.* (2006) isolaram espécies de *Aspergillus* como *A. chevalieri* (como *Eurotium chevalieri*), *A. repens* (como *E. repens*), e *A. rubrum* (como *E. rubrum*) presentes em um corpo mumificado, encontrado abandonado em uma casa e também em restos de um esqueleto descobertos em uma floresta. Nestes casos, contudo, os autores não focaram na determinação do IPM. No mesmo ano, Hitosugi *et al.* (2006) apresentaram um caso em que os fungos *Aspergillus terreus* e *Penicillium* sp., isolados da superfície da face de um cadáver encontrado em um poço, foram utilizados como ferramenta chave na determinação do IPM, posto que, não coube à Entomologia Forense auxiliar no caso, uma vez que não houve colonização de insetos ou outros artrópodes no corpo em putrefação (HITOSUGI *et al.*, 2006).

Para achados do Brasil, Moreira Filho (2008), em seu estudo com cadáveres humanos no estado do Ceará apresentou seis gêneros de fungos filamentosos, dos quais três foram igualmente relatados no presente trabalho: *Acremonium*, *Aspergillus* e *Mucor*. Cabe ressaltar que as condições ambientais em cada caso divergem das encontradas em ambiente de Mata Atlântica do sul do Brasil. Por conseguinte, destaca-se a necessidade de estudos semelhantes nas distintas regiões ao redor do mundo, com diferentes condições ambientais, para solidificar achados como os do presente estudo.

No que tange ao predomínio e a diversidade das leveduras durante o início e metade do processo cadavérico pode-se fazer uma relação com os fatores quantidade de substrato e microbiota do indivíduo. Sabe-se que com o cessar das funções vitais do indivíduo os mecanismos de reparo e defesa imunológica também cessam, trazendo condições favoráveis aos microrganismos partícipes na microbiota do sistema gastrointestinal e mucosas a intensificarem sua divisão, causando sua proliferação (VANRELL, 2007). Com o avançar da marcha cadavérica os tecidos sofrem degradação progressiva, ou seja, o substrato orgânico utilizado pelos fungos, bem como por bactérias e fauna cadavérica, vai diminuindo gradativamente, dificultando a

permanência de muitas espécies de leveduras nesse tipo de ambiente escasso.

A ocorrência de algumas espécies de leveduras no decorrer de todos os estágios da decomposição assemelha-se ao encontrado por Goebel *et al.* (2013), que também relatou o gênero *Candida* durante todas as amostragens realizadas em carcaça de suíno. Achados de *Candida* também são reportados por Moreira Filho (2008) em amostragens de período de esqueletização.

A levedura *C. lipolytica*, espécie encontrada em todos os estágios cadavéricos, é caracterizada por ser um organismo ubíquo, deste modo, tem sido isolada de diversos tipos de substratos como carnes refrigeradas, derivados de petróleo, materiais de agricultura, plantas e solo (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Já para os achados de *Arthrographis* não há registros em trabalhos semelhantes, mas é sabido que esta levedura é amplamente distribuída no solo, no ar e em alguns casos raros é reportada como patógeno oportunista (LIU, 2011), portanto, torna-se passível o seu desenvolvimento em material cadavérico exposto em ambiente de floresta.

Moreira Filho (2008) relata *C. guilliermondii* em amostragens de mucosas em cadáveres humanos em estágios mais iniciais do processo de decomposição.

Achados de *C. tropicalis* e *C. krusei* são citados como partícipes da microbiota encontrada no sistema gastrointestinal de suínos no trabalho de Van Uden *et al.* (1958), o que torna compreensível sua participação no processo decomposição do porco utilizado neste estudo.

A espécie *C. zeylanoides*, pouco encontrada neste experimento, é apontada como levedura de associação/infecção relativamente rara em humanos e animais (KHOSRAVI *et al.*, 2013), e alguns autores a têm descrito como um patógeno emergente, por ter sido reportada em isolados de amostras de pele, unhas e sangue (HAZEN, 1995). Esta espécie mostrou um grande potencial de marcador de intervalo *post mortem*, posto que, seu registro foi evidenciado em apenas um dos estágios, o de fermentação butírica, e em apenas um sítio de coleta. Este resultado ressalta a importância que há na realização de estudos semelhantes, para que a relação de fungos como *C. zeylanoides* com o IPM sejam bem conhecidos, para que a Micologia Forense se torne cada vez mais bem embasada e aplicável.

O gênero *Rhodotorula*, presente nos três primeiros estágios da putrefação, possui espécies que são caracterizadas como saprófitas,

portanto, estão comumente associados a ambientes naturais como solo, água, filoplano, etc. (LIU, 2011).

Na análise comparativa entre a quantidade de espécies apresentada nos três sítios de coleta avaliados, a pele se destacou como sendo o local que apresentou o maior número de espécies fúngicas, tanto de fungos filamentosos quanto de leveduras. Para tais achados não existe registro em trabalhos semelhantes para que se possa analisar comparativamente. A decomposição natural dos tecidos no decorrer do processo de putrefação permite que haja uma maior comunicação entre os sítios internos e externos do cadáver (VANRELL, 2007), e esta comunicação pode levar a microbiota interna a expandir seus sítios de colonização. Outro fator que deve ser levado em conta é que a pele, comparativamente aos outros dois locais de coleta, encontra-se mais suscetível à colonização de fungos exógenos ao porco, devido a sua grande área de exposição. Esses dois fatores juntos podem ter contribuído para que a colonização nas áreas da pele apresentasse um maior número de espécies do que as mucosas oral e nasal. Embora tenha ocorrido esse padrão na colonização dos sítios, seriam necessários mais estudos semelhantes para embasar tais achados e relacioná-los ao IPM.

Sabe-se que dentre os fatores ambientais, aqueles que causam maior interferência na dinâmica dos fungos são temperatura e umidade. Carroll e Wicklow (1992) salientam que esses fatores afetam tanto a disponibilidade de substratos e a eficiência com a qual esses substratos são utilizados pelos fungos, como agem na dinâmica populacional desses organismos saprófitos. Isso pode ser observado nos resultados apresentados neste trabalho quando se fez a correlação entre o fator temperatura e a quantidade de espécies presentes nos três diferentes sítios de coleta do porco. O único sítio que apresentou uma correlação moderada entre esses fatores foi o da mucosa anal. É muito provável que isto tenha ocorrido devido a maior disponibilidade de substrato presente na mucosa anal, comparado à mucosa oral, que rapidamente foi consumida no processo de decomposição, e a pele, que apresentou um ambiente mais seco. Portanto, a mucosa anal, por apresentar as melhores condições, como quantidade de substrato e umidade local, mediante a influência do aumento da temperatura ambiente, possibilitou o desenvolvimento de um maior número de espécies fúngicas.

Convém lembrar que apesar da Micologia Forense ser considerada uma ciência relativamente nova, não é recente a observação por médicos legistas da presença de fungos na superfície de cadáveres humanos. Contudo, o isolamento desses microrganismos não vem sendo realizado (ISHII *et al.*, 2006). A obtenção de dados dessa natureza

ajudaria a descrever e caracterizar melhor a sucessão fúngica em cadáveres e relacioná-la ao tempo de morte. Portanto, mais trabalhos no isolamento e identificação dos fungos que colonizam corpos em decomposição, realizados em diferentes regiões e climas variados são essenciais para permitir a obtenção de dados mais robustos capazes de consolidar a Micologia Forense e torná-la uma ferramenta aplicável nas práticas periciais.

Neste contexto, a biologia molecular, embora não tenha sido utilizada neste trabalho, tem se destacado como técnica importante em análises de composição fúngicas em diversas pesquisas. Sua utilização tem se tornado cada vez mais indispensável nas práticas laboratoriais, posto que, seus métodos são rápidos, simplificados, necessitam de quantidades mínimas de amostras (FUNGARO, 2000) e sua sensibilidade é capaz de detectar a presença de fungos que não possuem, por exemplo, a capacidade de crescimento em meios de cultura (O'BRIEN *et al.*, 2005). Portanto, análises realizadas através de biologia molecular são de extrema importância para fortalecer e dar ainda mais credibilidade a Micologia Forense.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- fungos leveduriformes foram mais diversos e predominaram os três primeiros estágios da decomposição;
- fungos filamentosos foram mais diversos e predominantes no penúltimo estágio de decomposição;
- a temperatura ambiente e a quantidade de substrato parecem ter influenciado a diversidade de espécies fúngicas da mucosa anal do suíno, apesar da correlação ter se mostrado moderada à baixa entre aquelas variáveis;
- a sucessão fúngica em cadáveres ainda não oferece função de marcador biológico efetivo que permita, com segurança, demonstrar a relação fungo-intervalo *post mortem*.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; DE ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

BARBEDO, L. S; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BONNET, A.; QUEIROZ, M. H. Estratificação vertical de bromélias epifíticas em diferentes estádios sucessionais da Floresta Ombrófila Densa, Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 2, p. 217-228, 2006.

BORNEMISSZA, G. F. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. **Australian Journal of Zoology**. v. 5, p. 1-12, 1957.

BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. **Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations**. 2th. Florida: CRC Press, 2010.

CAMPOBASSO, C. P.; DI VELLA, G.; INTRONA, F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. **Forensic Science International**. v. 120, p. 18–27, 2001.

CARROLL, G. C.; WICKLOW, D. T. **The fungal community: its organization and role in ecosystem**. 2th. New York: Marcel Dekker, 1992.

CARTER, D. O.; TIBBETT, M. Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. **Journal of Forensic Sciences**. v. 48, p. 1-4, 2003.

CARTER, D. O.; YELLOWLESS, D.; TIBBETT, M. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. **Naturwissenschaften**. v. 94, p. 12-24, 2007.

CARVALHO, L. M. L.; LINHARES A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in

southeastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**. v. 46, p. 604 – 608, 2001.

CENTRO DE ESTUDOS CULTURA E CIDADANIA - CECCA.
Unidades de Conservação e áreas protegidas da Ilha de Santa Catarina: caracterização e legislação. Florianópolis: Insular, 1997.

CHRISTENSEN, M.; TUTHILL, D. *Aspergillus* an overview.
In: SAMSON, R.; PITT, J. (Ed.). **Advances in Penicillium and Aspergillus systematics**. New York: Plenum Press, p. 195-209, 1985.

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

CROUS, P. W.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K.; GROENEWALD, J. Z.
The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. **Studies in Mycology**. v. 58, p. 1 – 253, 2007.

FRANÇA, G. V. **Medicina Legal**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1998.

FUNGARO, M. H. P.; PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 14, p. 12-16, 2000.

GHIZELINI, A. M.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C. Fungos presentes em acículas de *Pinus taeda* em estágios iniciais de decomposição no campo. **Boletim de Pesquisa Florestal**. v. 53, p. 155-178, 2006.

GOEBEL, C. S.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C.; PICANÇO, J. B.; ALHO, C. S. Análise micológica durante a decomposição cadavérica. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 12, n. 1, p. 28-32, 2013.

GOMES, H. **Medicina Legal**. 32.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos Editora, 1998.

GUNN, A. **Essential Forensic Biology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006.

HAGLUND, W. D.; SORG, M. H. **Forensic Taphonomy: the Postmortem Fate of Human Remains**. Florida: CRC Press, 1996.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HAWKSWORTH, D. L.; WILTSHIRE, P. E. Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. **Forensic Science International**. v. 206, p. 1-11, 2011.

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**. v. 8, n. 4, p. 240-242, 2006.

ISHII, K.; HITOSUGI, M.; YAGUCHI, T.; NISHIMURA, K.; HOSOYA, T.; TOKUDOME, S. Analysis of fungi detected in human cadavers. **Legal Medicine**. v. 8, n. 3, p. 188–190, 2006.

KALTSEIS, J.; RAINER, J.; DE HOOG, G. S. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. **Medical Mycology**. v. 47, n. 4, p. 398-405, 2009.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; NIKAEIN, D.; ERFANMANESH, A.; FATAHINIA, M.; ASHRAFI HLAN, J. Evaluation of the pathogenicity of *Candida zeylanoides* in BALB/c mice. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. v. 37, p. 408-413, 2013.

LIU, D. **Molecular detection of human fungal pathogens**. Florida: CRC Press, 2011.

MARQUES, A. M. A. **Entomologia Forense: Análise da Entomofauna em Cadáver de *Sus scrofa* (Linnaeus), na região de Oeiras, Portugal**. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

MENEZES, R. G.; JAIN, A.; KANCHAN, T.; MONTEIRO, F. N. P.; MANIPADY, S.; RAO, P. P. J. Forensic mycology. **Legal Medicine**. v. 9, n. 1, p. 48, 2007.

MOREIRA FILHO, R. E. **Micologia Forense: a dinâmica da microbiota fúngica na investigação do período *post mortem***. 2008.

133 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.

OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios**. 2. ed. Campinas: Millennium, 2008.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3th. New York: Springer Science, 2009.

PORTO FILHO, E. **Sedimentologia e algumas considerações sobre a bioquímica dos sedimentos do fundo da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina**. 1993. 343 p. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Programa de Pós-Graduação em Geografia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

RIES, A. C. R. **Sucessão da entomofauna associada a carcaças de *Sus scrofa* L. no sul do Brasil**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SANTOS, A. Tanatologia Forense. **Medicina Legal**. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2003. Disponível em: <<http://www.nhu.ufms.br/Bioetica/Textos/Morte%20e%20o%20Morrer/TANATOLOGIA%20FORENSE.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2013.

SCHOENLY, K.; HASKELL, N.; MILLS, D.; BIEME-NDI, C.; LARSEN, K.; LEE, Y. Using pig carcasses as model corpses. **The American Biology Teacher**. v. 68, n. 7, p. 402-410, 2006.

SHARMA, O. P. **Textbook of Fungi**. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1989.

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

SILVA, M.; MINTER, D.W. **Fungi from Brazil recorded by Batista and co-workers**. Wallingford: CAB International, 1995.

SIVANESAN, A. **Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs**. Wallingford: CAB International, 1987.

SOUZA, A. E. F.; VIEIRA, K. V. M.; GOMES, L. A. V. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em diversos setores do Centro de Ciências Biológicas e da saúde da Universidade Estadual da Paraíba. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 2, n. 2, p. 131-148, 2008.

STOKES, K. L.; FORBES, S. L.; TIBBETT, M.
Human versus animal: contrasting decomposition
dynamics of mammalian analogues in experimental Taphonomy.
Journal of Forensic Sciences. v. 58, n. 3, p. 583-591, 2013.

TAVARES, M. M. **O papel do ar e água ambientais como veículos de transmissão de infecções fúngicas no Hospital Agostinho Neto, Cidade da Praia, Cabo Verde**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular) – Universidade do Minho, Braga, 2012.

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

VAN UDEN, N.; SOUSA, L. D. C.; FARINHA, M. On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. **Journal of General Microbiology**. v. 19, n. 3, p. 435-445, 1958.

VOORDE, H. V.; VAN DIJCK, P. J. Determination of the time of death by fungal growth. **Zeitschrift fur Rechtsmedizin**. v. 89, p. 75–80, 1982.