

Microbiologia Forense: uma revisão

D.A.D. Weçoski *, P. Dalzoto

Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR) Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: deborahalinew@gmail.com. Tel.: +55-41-3361-1697.

Recebido em 01/02/2021; Revisado em 25/01/2023; Aceito em 21/02/2023

Resumo

A microbiologia forense é um ramo das ciências forenses que está ganhando crescente atenção como ferramenta investigativa. Atuando em conjunto com outras áreas, a microbiologia forense visa à análise e ao estudo de microrganismos que possam fornecer explicações sobre a ocorrência de crimes e servir como evidência em julgamentos. Visando fornecer um panorama sobre a microbiologia forense no mundo e no Brasil, foi realizada uma revisão de publicações sobre o tema dos últimos 22 anos (2000-2022), abordando o emprego de bactérias, fungos e vírus como ferramentas forenses. Foram encontradas 50 publicações, dentre os quais 39 foram publicadas em inglês e 11 em português, evidenciando a escassez de publicações sobre o tema no Brasil. Por meio da compilação dos artigos encontrados, esta revisão aborda preferencialmente bioterrorismo, biocrimes, o uso de bactérias da pele como forma de identificação humana, o microbioma humano na determinação do intervalo *post-mortem* e o emprego de fungos nas análises forenses.

Palavras-Chave: Microbiologia; Bactéria; Fungos; Vírus.

Abstract

Forensic microbiology is a branch of forensic science that is gaining increasing attention as an investigative tool. Acting in conjunction with other areas, forensic microbiology aims to analyze and study microorganisms that can provide explanations about the occurrence of crimes and serve as evidence in trials. In order to provide an overview of forensic microbiology in the world and in Brazil, a review of publications on the topic of the last 22 years (2000-2022) was carried out, addressing the use of bacteria, fungi and viruses as forensic tools. Fifty (50) publications were found, of which 39 were published in English and 11 in Portuguese, showing the scarcity of publications on the subject in Brazil. Through the compilation of the articles found, this review preferably addresses bioterrorism, biocrimes, the use of skin bacteria as a means of human identification, the human microbiome in the PMI determination and the fungi in forensic analysis.

Keywords: Microbiology; Bacteria; Fungi; Virus.

1. INTRODUÇÃO

Entre as ciências que possibilitam a análise de vestígios e fazem parte de investigações forenses, a biologia tem contribuído por meio de diferentes áreas, como a entomologia forense [1], entomotoxicologia [2] e genética e biologia molecular. A análise de DNA de resíduos encontrados em um local de crime possibilita a identificação do autor do ato ou da vítima, e, segundo um dos princípios fundamentais da ciência forense, o Princípio de Locard, “cada contato deixa um rastro” [3].

Outras áreas da biologia forense são a botânica [4], a toxicologia forense [5], a histologia forense [6], e a hematologia forense e seus estudos de manchas de sangue [7].

A microbiologia forense é um ramo relativamente novo da biologia e tem sido alvo de interesse crescente por parte de pesquisadores que buscam aumentar os meios de reconhecimento de provas e investigação de crimes [8].

Por meio de novas tecnologias, como o sequenciamento paralelo maciço de DNA [9], e outras técnicas moleculares como a PCR [10], a microbiologia forense pode fornecer importantes informações sobre crimes, auxiliando a análise das provas.

Através do crescente avanço nos estudos de microrganismos é possível agora que a microbiologia forense auxilie na análise de evidências criminais para a identificação de causas de morte, identificação humana, geolocalização e nas estimativas de intervalo pós-morte, tudo a partir da análise de fungos, vírus e bactérias [9]. Para

determinar a causa de morte como afogamento, por exemplo, o estudo de microrganismos presentes na água e em diferentes partes do cadáver pode auxiliar na investigação, uma vez que nestes casos é difícil determinar a causa da morte e muitas vezes isso é feito por meio da exclusão de outras causas nos exames realizados por patologistas [8].

O presente trabalho teve como intuito realizar uma revisão de publicações nacionais e internacionais de diferentes áreas da microbiologia forense, criando, assim, um panorama do que já foi produzido dentro desse ramo de investigação criminal nos últimos 22 anos (2000 - 2022), evidenciando a importância e o potencial da microbiologia forense.

2. METODOLOGIA

Optou-se pela utilização da revisão narrativa como meio para identificação e descrição dos estudos já realizados sobre microbiologia forense. A revisão narrativa é um tipo de estudo apropriado para descrever e discutir o desenvolvimento de determinado assunto a partir do ponto de vista teórico [11].

Para a escolha de publicações sobre o tema foi realizada uma busca nos bancos de dados *Google Scholar* e *PubMed* (NCBI) no período compreendido entre os anos 2000 e 2022. As seguintes palavras chaves foram utilizadas: “*forensic microbiology*”, “*forensic microbiology and bacteria*”, “*forensic microbiology and fungi*”, “*forensic microbiology and virus*”, “microbiologia forense”, “microbiologia forense e bactéria”, “microbiologia forense e fungos” e “microbiologia forense e vírus”.

3. RESULTADOS

Foram analisadas 50 publicações entre os anos 2000 e 2022. Os anos com mais publicações foram 2015 (6) e 2019 (5) (Figura 1), sendo a média de publicações por ano em torno de 2,27.

As publicações sobre microbiologia forense foram as mais frequentes (24), abordando principalmente a análise de bactérias presentes na pele e o microbioma humano, enquanto sobre micologia forense foram encontradas 15 publicações. As demais publicações (11), versam sobre as ciências forenses (2), técnicas de biologia forense (8) e tipos de revisão bibliográfica (1).

Dentre as publicações analisadas, apenas 12 são oriundos do Brasil, o que corresponde a cerca de 25% do total de publicações consideradas nesta revisão, e destas, 4 abordam a micologia forense. Isso evidencia que a área de microbiologia forense no Brasil ainda apresenta escassez de trabalhos e abre inúmeras possibilidades de investigações.

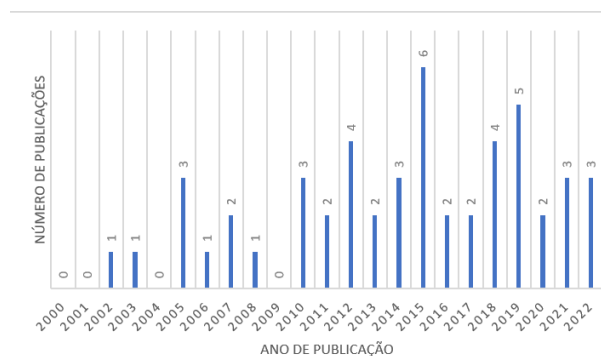


Figura 1. Publicações sobre microbiologia forense entre os anos 2000 e 2022.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Histórico da Ciência Forense

A ciência forense relaciona questões de justiça e ciência, tratando-se de um sistema complexo que é composto por diferentes saberes [12]. A perícia criminal é aquela que tem como finalidade indicar aos operadores do Direito, explicações e provas sobre o que e como uma situação ocorreu.

Os primeiros registros acerca da ciência forense datam do século VII, na China, onde já se buscava fazer uso de vestígios e da lógica para a resolução de crimes. Mas somente no século XIII o primeiro compêndio de medicina legal seria produzido pelo juiz Song Ts'Eu no campo do Direito. No compêndio eram descritas maneiras de identificar sinais de estrangulamento e afogamento, também constava o modo como a análise de ferimentos poderia levar a inferências sobre as armas utilizadas em um crime [3].

Momentos históricos do início da ciência forense foram a criação das leis por Carlos Magno, primeiro esboço do que seria um laudo pericial; as Decretais do Papa Gregório IX, no século XIII, que indicavam a necessidade de perícia médica em casos de mortes violentas e lesões corporais; o Código Carolíngio de 1532, que estipulou a obrigatoriedade de exames realizados por peritos médicos nos corpos de vítimas de mortes violentas e a seguinte manifestação por escrito sobre os resultados dos exames, estabelecendo, assim, o início do que conhecemos como necropsia e laudo pericial [3].

Outros movimentos, que modificariam a ciência forense para o modo como a conhecemos atualmente, ocorreram também na França, Inglaterra e Portugal. Nesse último país, em 1602, a criação da função de peritos separada do órgão judiciário, ainda que auxiliar deste, foi o primórdio do que conhecemos hoje como Instituto de Criminalística, apesar de não ter essa denominação à época [3].

Entre os séculos XI e XIII surgiram os primeiros métodos e instrumentos forenses, e o aperfeiçoamento de

tais técnicas através dos anos tornou possível a investigação de crimes do modo como ocorrem atualmente. Entre os momentos importantes de descobertas, que possibilitaram a investigação e análise de vestígio, estão a invenção do microscópio em 1590, por Zacharias Jansen; o trabalho do médico italiano Marcelo Malpighi de 1664, onde tratava sobre o que seria a origem da papiloscopia; o início da produção de armas com almas raiadas e a possibilidade de se estabelecer a relação entre uma arma utilizada e um crime, no século XIX; a invenção da fotografia em 1826 e a primeira coletânea de fotos de criminosos produzida em 1886 por Thomas Byrnes; e a publicação do livro de Mathieu Orfila, em 1815, em que foi feita uma classificação dos venenos mais utilizados em crimes. Mais tarde, seriam produzidas técnicas e instrumentos para auxiliar em investigações, como o assinalamento antropométrico, fotografia judiciária e a criação de manuais para juízes e peritos responsáveis pela investigação e julgamento de crimes [3].

Um marco importante nas ciências forenses se deu com a implementação de análises do DNA para a identificação de indivíduos. O primeiro método de análise foi desenvolvido por Alec Jeffreys em meados dos anos 80, e, posteriormente, as técnicas de análise foram aperfeiçoadas para que não somente células nucleadas fossem passíveis de extração de DNA. Atualmente diversos espécimes de material biológico passaram a servir à análise, tais como amostras de sangue, saliva, sêmen, dente, unha, urina e outros fluidos. É papel da biologia molecular, dentro dos laboratórios, a análise das amostras de material biológico recolhido de cenas de crimes, atuando de forma imprescindível na identificação de criminosos e de outros aspectos dentro da investigação [13].

4.2. Microbiologia Forense

A ciência forense é uma ciência multidisciplinar, podendo muitas vezes promover a interação entre áreas de diferentes ciências para embasar seus achados. A utilização de conhecimentos e técnicas de diferentes áreas é responsável pela composição de conjuntos de análises que proporcionam o exame de todos os componentes envolvidos na investigação criminal, sendo então, ampla a variedade de ciências que podem contribuir para a perícia na área forense [3].

4.2.1. Bioterrorismo

A biologia em investigações forenses tem um importante papel na coleta e análise de vestígios. Microbiologistas forenses têm, entre suas diversas funções, a análise de vestígios de evidências para colocar suspeitos ou vítimas nas cenas de crimes, a investigação de crimes de bioterrorismo e determinação de causa e hora de morte. Embora a microbiologia forense já existisse, foram os eventos de bioterrorismo ocorridos nos Estados Unidos em

2001, em que a bactéria *Bacillus anthracis* foi utilizada, que trouxeram essa área da ciência para a linha de frente das investigações criminais [8].

No caso conhecido como Amerithrax, cartas contendo esporos de *B. anthracis* foram enviadas para senadores americanos e pessoas ligadas à mídia dos Estados Unidos e acarretaram vinte e dois casos de infecção e cinco mortes [14].

A investigação forense do caso das cartas contaminadas fez uso de variadas abordagens, entre elas as análises física, química e molecular. A investigação dependeu fortemente das análises genéticas e genômica comparativa. A análise de DNA para identificação microbiana não era novidade em 2001, porém, as tecnologias utilizadas na época eram ainda incipientes, trabalhosas, caras e demoradas. Outros fatores que estavam presentes na investigação e poderiam ser possíveis complicadores para a análise de evidências era o vasto número de microrganismos e as rápidas mutações pelas quais esses organismos passam, levando a incertezas a respeito do seu uso em investigações. Para solucionar o caso, o trabalho da perícia microbiana e da investigação da polícia tradicional foi indispensável [14].

O *B. anthracis* é um patógeno que está presente em todo o mundo, mas é altamente homogêneo geneticamente. O caso de bioterrorismo envolvendo o *B. anthracis* foi o que levou ao desenvolvimento do VNTR (*Variable Number Tandem Repeat* ou Número Variável de Repetições em Tandem) [14].

Após a análise do material, observação das mutações do bacilo e do trabalho conjunto com diversos setores de investigação americana, as cartas foram traçadas até o cientista Edwards Bruce Ivens, que foi considerado o responsável pelos ataques [15].

4.2.2. Biocrime

Em situações de biocrime, ação na qual uma pessoa ou um grupo de pessoas causa danos intencionais a outra determinada pessoa ou grupo, o estabelecimento da relação entre o agente infeccioso e a amostra individual retirada da vítima deve provar uma associação entre ambos, o que demonstra que a análise molecular do genoma é de extrema importância. O microbiologista forense pode escolher entre diferentes métodos para a análise de DNA de vírus e bactérias, de acordo com as circunstâncias em que um ataque ocorre. Fluidos corporais e evidências ambientais são recolhidas de suspeitos de bioterrorismo e biocrime, e tais amostras passam então para a análise e estudo filogenético de bactérias e vírus, para então se tornarem evidência durante um julgamento [8].

Casos ocorridos nos Estados Unidos exemplificam o uso de tais técnicas para fins forenses. Em 2012, um cientista de laboratório norte americano foi preso por infectar pacientes com hepatite C deliberadamente. No incidente o cientista, HCV positivo, utilizou seu próprio sangue para contaminar equipamentos e seringas que

seriam utilizados em paciente nos hospitais em que trabalhava, 18 no total. Devido ao grande número de hospitais em que o suspeito trabalhava, não foi possível estabelecer um número total de vítimas do biocrime, mas somente no hospital em New Hampshire 32 pacientes foram infectados [8].

Ainda nos Estados Unidos, um dentista entregou voluntariamente sua licença profissional e foi alvo de diversos processos após descobrirem suas práticas insalubres e não estéreis em cirurgias. O dentista possuía 7.000 pacientes, dos quais 4.000 foram testados. Mais de 70 pacientes testaram positivo para vírus da hepatite C, cinco para hepatite B e quatro para HIV [8].

Em Lafayette, em 1994, uma importante investigação ocorreu no caso de um gastroenterologista que deliberadamente infectou sua ex-namorada com uma mistura contendo o sangue de um paciente seu, que era HIV positivo. Durante uma briga, o gastroenterologista aplicou uma injeção intramuscular em sua então namorada. Juntamente com a colaboração da força policial que conduziu entrevistas com antigos parceiros da vítima e outras buscas, foram realizados exames de sangue da vítima, do paciente e de amostras de sangue de uma população local, HIV positiva. A utilização da PCR e a transcriptase reversa do HIV isoladas da vítima, mostraram que a linhagem do HIV da vítima era a que estava mais intimamente ligada ao paciente, apontando para a direção da transmissão do paciente para a vítima. O caso levou à condenação do gastroenterologista por tentativa de homicídio de segundo grau [16].

4.2.3. Microbioma humano na identificação de indivíduos e na determinação do intervalo post-mortem (IPM)

O Projeto Microbioma Humano (HMP) estima que o corpo humano tem dez vezes mais células microbianas do que células humanas. Seu papel está relacionado à manutenção da saúde do hospedeiro, e especialmente o microbioma intestinal pode ser associado a inúmeras doenças, como síndromes metabólicas, obesidade, diabetes e depressão [17]. Além disso, o microbioma pode ser uma ferramenta importante em estudos que visam identificar indivíduos e que podem ter aplicação nas ciências forenses. Estima-se que um organismo humano libere 36 milhões de células microbianas por hora, deixando um rastro de evidências que pode ser seguido [18].

O microbioma da pele é muito diverso e característico de indivíduos, apresenta uma estabilidade que é mantida ao longo do tempo, e representa uma assinatura pessoal [18], podendo ser empregado no estudo da composição da comunidade de bactérias associadas à pele que são deixadas em objetos após o contato, para fins forenses. Em um estudo de 2010 [19], foi levantada a hipótese de que o padrão bacteriano individual pudesse servir como um tipo de impressão digital na investigação forense. A partir disso,

foi desenvolvido um estudo que visou à análise comparativa de culturas de bactérias encontradas em teclados e mouses de computador de uso pessoal e as comunidades de bactérias encontradas na palma da mão de seus respectivos donos. Foi demonstrado que as culturas de bactérias pertencentes aos donos dos respectivos teclados eram substancialmente mais similares do que as amostras coletadas de teclados diversos. As semelhanças entre as culturas de bactérias do teclado, mouse e da palma da mão do indivíduo a quem o teclado pertencia sugere a transferência entre pele e objeto, e tais culturas podem servir como um tipo de impressão digital.

Outro estudo que ressaltou a interação entre o microbioma humano, e os resquícios deste, deixados em objetos, foi realizado por Lax *et al.* [20]. No referido estudo, foram comparadas amostras de culturas de bactérias retiradas de telefones celulares e solas de sapatos de participantes, com o intuito de demonstrar a possível ligação entre a sola de sapato e o chão que esses indivíduos haviam caminhado, assim como a relação entre o microbioma pessoal dos participantes e os resquícios deixados em seus respectivos telefones celulares.

Tendo sido recolhidas amostras de telefones celulares, sapatos, do chão e dos participantes, dois métodos diferentes foram realizados para a análise e comparação das amostras. Os resultados encontrados permitiram inferir que as colônias de bactérias encontradas nos telefones celulares podem ser relacionadas aos seus respectivos donos. Porém, os resultados encontrados na análise de bactérias retiradas de sapatos e dos locais onde os indivíduos tinham pisado se mostraram insuficientes para produzir relações, devido à influência sofrida pelas trocas rápidas de bactérias que acontecem com as superfícies [20].

A relação entre o microbioma humano e sua presença reconhecível em sapatos também foi objeto de pesquisa de Goga [21], em um estudo que buscou a relação entre as bactérias da sola do pé e da parte interna de sapatos.

Para o estudo foram utilizados 14 pares de sapatos de 14 voluntários diferentes, e amostras foram recolhidas dos voluntários e dos objetos. Os resultados apontaram para uma maior similaridade entre o DNA bacteriano dos donos dos respectivos sapatos e os mesmos. Apesar dos resultados indicarem que as bactérias associadas à pele, retiradas da sola dos pés de um suspeito, podem oferecer uma boa comparação com um sapato encontrado em uma cena de crime, por exemplo, ainda podem ser problemáticas, devido ao grau de flutuação de semelhanças das bactérias encontradas em ambas as amostras. Assim os resultados de comparação podem não se mostrar significativos o suficiente para oferecer uma correspondência. Tal problemática, segundo o estudo, pode ser devida a uma possível contaminação dos sapatos com outras bactérias presentes no chão, quando os indivíduos tiram os sapatos em casa, sendo que o andar pode causar a

contaminação com outras bactérias do ambiente. Outros fatores possíveis apontados foram a transferência de bactérias de outras pessoas, quando os indivíduos andam descalços, carregando assim essas bactérias em seus pés e sapatos, infecções microbianas e o método de análise bacteriano utilizado [21].

A relação entre o DNA bacteriano de um indivíduo e os resquícios deixados em superfícies tocadas pelo mesmo indivíduo também foi demonstrada por Lee [22]. Em estudo realizado para determinar se era possível estabelecer ligação entre sujeito-objeto através da análise de DNA bacteriano deixado em peças de roupa, tecidos como algodão 100%, algodão 55% e poliéster 45%, e 100% poliéster, foram utilizados. Voluntários agarraram firmemente as amostras de tecido e DNA bacteriano foi retirado dos tecidos, da palma da mão e da ponta dos dedos dos participantes da pesquisa. Os microrganismos encontrados nas amostras de cada voluntário diferiram significativamente entre eles, e apesar do estudo dever ser considerado com cautela devido ao baixo número de participantes e amostras, foi possível confirmar a relação entre as bactérias presentes nas mãos de cada voluntário e dos tecidos analisados.

Em um estudo de 2020 [18], Hampton-Marcell *et al.* demonstraram que humanos deixam assinaturas microbianas após contato com superfícies em uma casa, permitindo que pessoas sejam associadas às superfícies com uma acurácia de 20 a 25%. Estes autores também demonstraram que o microbioma da pele contém taxa raras que podem levar a um perfil microbiano único, que pode ser usado na identificação de criminosos, embora sejam necessários mais estudos para implementar definitivamente esta metodologia.

Durante séculos a utilização de fios de cabelos em investigações limitou-se a comparações entre a cor do fio de cabelo e pigmentação. Foi somente na metade dos anos 80 que a técnica PCR – *Polymerase Chain Reaction* - (Reação em Cadeia da Polimerase) proporcionou uma mudança importante na análise de fios de cabelo, contribuindo com o estudo de DNA realizados nos fios. Contudo, a realização da análise do fio só poderia se dar com fios de cabelos que estivessem em sua fase anágena, fase na qual são ricos em DNA nuclear [22]. Uma alternativa de investigação favorecida pela análise metagenômica, abordagem independente de cultura bacteriana, é a impressão digital microbiana que pode ser coletada dos fios [23,24].

Sendo os fios de cabelo uma das evidências mais presentes em cenas de crimes, Tridico *et al.* [24] realizaram um estudo visando determinar o possível uso da análise de bactérias presentes em fios de cabelo para fins forenses. Amostras de fios do couro cabeludo e pelos pubianos foram coletadas de sete voluntários, dois dos quais eram um casal, em três meses diferentes. Os resultados demonstraram a relação de diferentes tipos de bactérias em

diferentes partes do corpo, sendo que não foram notadas dessemelhanças significativas entre sexos no que tange às amostras de fios retirados do couro cabeludo. Já a partir das amostras de pelos pubianos é possível estabelecer uma notável diferença entre pelos masculinos e femininos por suas respectivas microbiotas, sendo a presença de *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus gasseri* predominante no sexo feminino.

A identificação da causa de morte envolvendo microrganismos pode ser difícil de ser realizada mediante autópsia, por falta de informação *ante-mortem*.

Embora se saiba o papel destes microrganismos em um ser vivo, pouco se sabe sobre as mudanças na microbiota após a morte, o que constitui o Tanatomiobioma. Numa perspectiva forense, os microrganismos encontrados em um corpo após a morte podem ser divididos em tanatomiobioma, aqueles presentes em órgãos e fluidos após a morte, e microrganismos epinecroticos, que são encontrados na superfície dos restos em decomposição [25].

Logo após a morte, inicia-se o processo de decomposição microbiana. O sistema imune cessa sua atividade e a temperatura corporal é alterada, favorecendo a colonização por microrganismos. As mudanças que ocorrem no corpo após a morte dificultam a identificação e separação de microrganismos que podem ser a causa de morte, microrganismos comuns à microbiota que se tornam fonte de patologias quando estão em circunstâncias propícias, e os microrganismos que podem contaminar o cadáver antes ou durante a autópsia [26]. Diferentes fatores podem levar à presença de bactérias nas amostras, tais como a invasão durante a vida, o que pode atestar a causa de morte por infecção; a propagação agonal, na qual seria possível que bactérias invadissem uma superfície do corpo durante procedimentos de ressuscitação ou então por problemas na circulação sanguínea; a translocação pós-morte, na qual bactérias que estão presentes naturalmente no corpo podem atravessar as barreiras das mucosas e causar a proliferação de diferentes bactérias; e contaminação, a qual poderia ocorrer durante a retirada das amostras [25].

Colocados os possíveis entraves no processo de identificação de bactérias que estariam presentes antes ou após a morte, grande parte dos estudos realizados para compreender como tais fatores podem atrapalhar na identificação de microrganismos como causa de morte, apontam para a segurança dos achados acerca de microrganismos em autópsias, desde que o corpo tenha sido devidamente refrigerado e não se trate de autópsias de crianças menores de 2 anos. De modo geral devem ser observados os níveis de proteína c-reativa, uma lista de microrganismos que podem ser considerados patógenos oportunistas quando há alguma doença subjacente, histologia e problemas relacionados à imunidade. Apesar de alguns microrganismos como *Escherichia coli* e

Candida albicans fazerem parte da nossa microbiota e poderem se tornar patogênicos em circunstâncias específicas, uma lista completa de patógenos verdadeiros não é possível de ser concluída, sendo recomendado procurar literatura para cada tipo de microrganismo encontrado, uma vez que as outras informações citadas anteriormente tenham sido consideradas [26].

As mudanças que ocorrem na microbiota à medida que o cadáver passa pelos estágios da decomposição podem ser usadas como um relógio microbiano post-mortem, que pode levar ao estabelecimento do intervalo *post-mortem* (IPM) [27,28], que é fundamental para reconstruir cenas de morte, sejam por homicídios, mortes suspeitas ou mesmo naturais [34].

O PMI pode ser estimado por vários métodos, e em geral, utiliza-se uma combinação de diferentes abordagens, para melhorar a sua acurácia. Informações sobre as atividades prévias do indivíduo, associadas com sinais biológicos e ambientais, podem contribuir para essa determinação, embora todos os métodos sejam dependentes de muitas variáveis [28].

A metagenômica surge como uma alternativa para caracterizar o microbioma humano, fornecendo um padrão comparável, que pode ser aplicado em associações entre indivíduos e objetos encontrados em cenas de crimes [29,30]. A análise do microbioma de diferentes locais do corpo e diferentes ambientes pode ser empregada para determinar a localização geográfica de crimes e ainda determinar a causa da morte, bem como a identidade dos indivíduos [31-33].

Apesar do potencial que essa técnica apresenta, uma série de dúvidas podem surgir, como por exemplo o tempo dispendido para a transição entre a microbiota *ante-mortem* e *post-mortem*. Visando elucidar essa questão, Pechal *et al.* [30] estudaram a microbiota da pele de 6 partes do corpo de 188 cadáveres, em Detroit, *Michigan*, EUA. Os autores concluíram que a diversidade dos microrganismos permanecia estável até 48 horas após a morte. Kodama *et al.* [29] coletaram amostras de *swabs* de pele e objetos em 16 cenas de crime com morte, em Honolulu, Hawaii, em diferentes momentos: na chegada à cena de crime, na chegada ao necrotério e em intervalos de 6 horas até o momento da autópsia. As conclusões do estudo demonstram que a microbiota da pele permanece estável nos diferentes momentos e que, objetos das vítimas, apresentam os mesmos microrganismos, em taxas que vão de 100 a 50% de coincidência, sendo maiores em objetos de uso pessoal, como óculos, bengalas e utensílios médicos. Com isso, os autores sugerem que o microbioma da pele pode ter importante papel na identificação de indivíduos, como técnica complementar às impressões digitais.

Recentemente, em 2022, o papel forense dos microrganismos encontrados em marcas de mordidas começou a ser explorado experimentalmente, uma vez que,

nos tribunais, são usadas apenas comparações morfológicas entre marcas e arcadas dentárias [34]. Nesta revisão, os autores descrevem que o estudo do genoma de *Streptococcus* sp. encontrado nestas marcas de mordida pode levar à associação com o microbioma oral do suspeito.

4.2.4. *Micologia forense*

O estudo de fungos em investigações forenses, a micologia forense, ainda é uma área que possui pouca literatura disponível, sendo então os estudos publicados até o momento uma base para futuras investigações sobre suas possíveis contribuições para as ciências forenses. A análise de fungos pode ser utilizada para a estimativa do tempo de morte, tempo de decomposição, no fornecimento de evidências residuais e na determinação de causa de morte em casos de intoxicações [35].

A utilização da análise de fungos para o estabelecimento do intervalo *post-mortem* tem sido a maior contribuição do estudo de fungos na área forense. A partir da identificação dos tipos de fungos encontrados em um determinado ambiente ou cadáver, e das observações de como ocorrem as interações com outros compostos do ambiente, é possível estabelecer o intervalo *post-mortem*. A sucessão do crescimento fúngico e o uso de nitrogênio permitem estabelecer uma estimativa do intervalo. Ainda são necessários mais estudos para estabelecer uma base confiável de fungos, sua presença nos estágios de decomposição cadavérica e a interação com o tipo de ambiente onde se encontram, mas segundo [35], fungos de grupos como os Zygomycetos, Ascomycetos e mitosporicos, de frutificação precoce, e os Basidiomycetos, de frutificação tardia, são destacados para a análise de decomposição. Grupos de fungos que formam corpos de frutificação em condições naturais após a decomposição cadavérica podem ser chamados de fungos *post putrefaction*, enquanto fungos que formam corpos de frutificação no solo após tratamento com amônia são os chamados fungos ammonia [35].

Um exemplo da análise de fungos em investigações para o estabelecimento do intervalo de morte vem de Voorde e Van Dijck [36], onde fungos encontrados no corpo de uma baronesa assassinada foram isolados e incubados a fim de reproduzir o ambiente exato no qual o cadáver foi encontrado. Através da análise do crescimento dos fungos foi possível estabelecer o intervalo de tempo de 18 dias da ocorrência do crime até a descoberta do corpo, informação posteriormente confirmada quando o responsável pelo crime foi descoberto.

Outro caso semelhante, citado por Lehman [8], é o da investigação de um corpo encontrado com múltiplas marcas de esfaqueamento em um apartamento fechado, o que impediu a entrada de mosquitos. Os cientistas forenses no caso notaram a presença de fungos nas manchas de sangue no carpete onde o corpo estava. Uma parte do

carpete sem manchas de sangue foi removido pela equipe forense e foi mantido em laboratório sob condições de umidade e temperatura semelhantes ao do apartamento onde ocorreu o crime, após ser manchado de sangue bovino. As colônias de *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium citrinum* e *Mucor plumbeus* encontradas na cena do crime foram comparadas com as resultantes do carpete mantido em laboratório, o que possibilitou a estimativa do tempo de morte em 5 dias. A estimativa foi confirmada quando o suspeito de ter cometido o crime confessou.

Em uma análise de fungos realizada em 1996, os fungos identificados como *Penicillium* e *Mucor* foram coletados do corpo de uma mulher morta em seu apartamento, e estudados em ambientes artificiais por 28 dias. Esse tempo permitiu estabelecer o intervalo de morte da vítima e contribuir para a condenação do assassino. Em mais uma contribuição para a área forense, a análise de fungos em restos de comida deixadas em um apartamento pôde ser utilizada para delimitar o intervalo de tempo em que crianças foram deixadas sozinhas em um apartamento pela mãe, que acabou sendo acusada da morte de um dos filhos por negligência [37].

Um caso no qual uma vítima de estupro afirmava ter sofrido abuso sexual próximo a determinadas árvores, enquanto o suspeito afirmava ter tido relações sexuais consensuais com a vítima em um parque a 200 metros de distância, foi esclarecido com a comparação dos fungos característicos de madeira e folhas mortas encontrados nas roupas e sapatos da vítima e do suspeito. Apesar da proximidade entre os locais, a análise dos fungos se mostrou significativa o bastante para corroborar a denúncia da vítima. Confrontado com as evidências, o suspeito confessou [36].

Em Dundee, na Escócia, o corpo de uma mulher que fora estuprada e morta, foi cremado antes que um micologista pudesse examiná-lo. Porém, com as anotações realizadas sobre o estado do corpo e do crescimento extensivo de fungos que o corpo da mulher apresentava, foi possível estimar que a mulher estivera no local por pelo menos duas semanas e, somado ao pólen encontrado e esporos de fungos, estabeleceu-se uma ligação também com o suspeito e o local onde o corpo foi encontrado. Outras evidências, como a filmagem de câmeras com os envolvidos e uma extensa ficha criminal, acabou acarretando a condenação do suspeito [37].

No Japão, o corpo de um homem de aproximadamente 71 anos foi encontrado em um poço aberto, sua face coberta com colônias de fungos brancos. A identificação dos fungos *Penicillium sp.* e *Aspergillus terreus* ajudaram a corroborar a estimativa do tempo de morte, pois o homem havia sido visto pela última vez doze dias antes de ser encontrado [38].

Em estudo realizado no Ceará, Brasil, com a coleta de amostras retiradas de 60 cadáveres em diferentes estágios

de decomposição (gasoso, coliquativo e de esqueletização), os resultados de isolamento de fungos mitosóricos mostraram a prevalência da forma filamentosa nos períodos gasoso e de esqueletização, e de leveduras no período coliquativo. No que diz respeito às ordens fúngicas avaliadas, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, da ordem *Eurotiales*, apareceram nos períodos gasoso e de esqueletização. De modo geral, os resultados encontrados nas amostras apontam para a prevalência dos gêneros *Aspergillus* e *Candida* no período gasoso, *Candida sp.* no período coliquativo, e *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* e *Mucor spp.* no período de esqueletização [39,40].

Apesar dos bons resultados demonstrados em diversas investigações, os métodos para a análise de fungos utilizados como evidência ainda não são robustos o suficiente para terem ampla aceitação em tribunais de justiça [36].

Sendo os fungos em cadáveres passíveis de serem reconhecidos como causa de morte e possibilitando estabelecer o intervalo de morte, Sidrim *et al.* [41] realizaram a análise de 23 cadáveres em diferentes estados de putrefação para tentar identificar algumas das espécies fúngicas presentes e seu potencial infeccioso para os indivíduos que realizam as autópsias. Dentre as espécies identificadas, *Aspergillus fumigatus* e *Candida Albicans* estavam entre os fungos que podem causar complicações de saúde para os analistas em caso de contaminação, principalmente para aqueles que possuem doenças subjacentes, como problemas pulmonares e diabetes mellitus. Os autores salientam ainda a importância dos equipamentos para a realização de autópsias, e que mesmo com as diferenças entre países, todas as autópsias deveriam incluir luvas de dupla camada, com uma camada interposta à prova de corte, vestimenta impermeável e máscaras faciais para impedir a contaminação pelo ar.

A análise fisiológica de fungos pode também ser utilizada para a localização de túmulos e para a estimativa do tempo decorrido desde o enterro de cadáveres [35]. Sendo alguns fungos causadores de doenças, além de causas de morte, análises forenses de fungos que colonizam construções também devem ser consideradas [37].

O uso do solo como traço de evidência [37], e como meio de identificar locais onde restos humanos foram enterrados, tem ganhado espaço ao lado da entomologia nas investigações criminais. Os fungos encontrados no solo podem servir como lápides acima do solo, segundo Tranchida *et al.* [42], em seu estudo no solo, onde restos humanos foram encontrados, apontaram, assim como estudos anteriores, a presença de fungos amônia e os chamados fungos *postputrefaction*. Em estudo utilizando a carcaça de um suíno enterrada para realização de análise do solo, encontraram maior diversidade de fungos presentes no solo no período gasoso de decomposição, seguido de um menor número encontrado no período de

apodrecimento, causado pela maior competição microbiana e de outros insetos [16,42].

Piazza *et al.* [43] avaliaram 2 cadáveres preservados em condições controladas por 6 semanas em uma funerária: um homem de 78 encontrado em casa, 3 dias após a morte, e um homem de 84 anos, morto em um hospital. Os autores isolaram mais de 70 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) fúngicas, mapeando os dois corpos de acordo com os fungos isolados. As diferenças entre os dois cadáveres foram atribuídas ao período perimortem, demonstrando que esta fase influencia a colonização fúngica. No primeiro caso, a colonização iniciou na face, braço esquerdo e tornozelos, após 6 dias foram observados fungos em todo o corpo. Os fungos encontrados foram *Penicillium polonicum* e *P. rubrum*. No segundo caso, os fungos *P. expansum* e *Cladosporium cladosporioides* foram observados apenas na cavidade oral.

Os autores [43] confirmaram a importância do estudo da taxa de crescimento fúngico e das condições ambientais no momento da morte para determinação do IPM. Esta estimativa pode ser realizada por comparação do crescimento fúngico nos cadáveres com dados disponíveis em manuais de identificação fúngica.

Recentemente, diversos autores têm utilizado o tanatomiocriobioma para identificar fungos em amostras de DNA total de solo [44] ou de corpos [45]. Em sua revisão, Wójcik *et al.* [45], relatam a ocorrência de fungos em diferentes estágios de decomposição e locais do corpo. *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium rugulosum* e *Penicillium spp* foram encontrados no cabelo de cadáveres putrefeitos e em fase de esqueletização. Na pele, foram encontrados *A. niger*, *A. flavus*, *P. rugulosum* e *Candida albicans*. Em mucosas, além destes já descritos, foram recuperados *C. guilliermondii* e *Pichia piceum*. Nos ossos, solo e roupas, foram predominantes *A. niger*, *A. flavus* e *Penicillium spp*. Essa estratégia aumenta a capacidade de recuperar os microrganismos, uma vez que não depende de isolamento e crescimento em laboratório. Acredita-se que esse tipo de metodologia poderá contribuir futuramente para a elucidação do local da morte e, até mesmo, do tempo de morte, dependendo dos microrganismos encontrados.

Beckett *et al.* [46], em um estudo de 2022, relataram a presença de três fungos nunca anteriormente descritos em restos mortais humanos, na Estação de Pesquisa em Investigação Forense (FIRS) em *Whitewater*, Colorado, EUA, um ambiente desértico. Dois cadáveres em estágios de decomposição tardios foram utilizados no estudo, com IPM estimados respectivamente em 1520 dias e 1820 dias. Ambos apresentavam uma crosta negra na pele remanescente, e a partir do isolamento, crescimento e sequenciamento de rDNA nuclear, foram identificados *Aerobasidium melanogenum*, *Didymella glomerata* e *Alternaria sp.*

Tavares [47] isolou fungos filamentosos e leveduras da pele de 20 cadáveres em estágio de putrefação e de 29

ossadas humanas, armazenados no Instituto Médico Legal de Curitiba. Estes isolados foram caracterizados morfológicamente e por sequenciamento das regiões ITS do rDNA e identificados como *Alternaria sp.*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Debaryomyces hansenii*, *Fonsecaea sp.*, *Hyphodontia microspora*, *Mucor (M. circinelloides e M. racemosus)*, *Oidiodendronem sp.*, *Penicillium commune*, *Phanerochaete pseudomagnoliae*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Trametes sanguinea* e *Yarrowia deformans*. Em cadáveres putrefeitos, foram encontrados *Candida sp.*, *Cladosporium cladosporides*, *Fonsecaea sp.* e *Trichosporon sp.* Observou-se a predominância de leveduras em cadáveres e fungos filamentosos em ossadas, com maior incidência de *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* Este trabalho é o primeiro relato dos fungos *Aspergillus chevalieri*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Phanerochaete pseudomagnoliae*, *Yarrowia deformans*, *Hyphodontia microspora* e *Debaryomyces hansenii* isolados de ossadas e cadáveres putrefeitos. Estes resultados constituem um estudo pioneiro no Estado do Paraná e sugerem que fungos podem ser usados como ferramentas adicionais nos estudos forenses

5. CONCLUSÕES

O uso da microbiologia forense na identificação da causa de morte, casos de intoxicação, estabelecimento do intervalo de morte, identificação de microrganismos no solo em locais de crime, contaminação proposital ou acidental de indivíduos com agentes infecciosos, e evidências de transferência de bactérias que podem ajudar a estabelecer o suspeito de um crime foram os casos mais encontrados na literatura.

Fica evidente a importância da microbiologia forense para auxiliar os outros métodos de investigação na compreensão do que ocorreu em cenas de crime, morte acidental e outros tipos de casos, visando o esclarecimento dos fatos e obtenção de justiça.

Desse modo, um maior número de estudos pode auxiliar na construção de uma base de dados robusta e segura a ser utilizada em investigações. A partir dos estudos realizados, é possível perceber que a microbiologia forense tem potencial para ser utilizada em diversos casos de investigações, abrindo cada vez mais o leque de aplicações dessa ciência na resolução de crimes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] H.C. Crisóstomo, L. Gomes, F. Prezoto. Análise de artigos relacionados à entomologia forense publicados em periódicos brasileiros. *Revista Brasileira de Zootecias* **14**, 2012.

- [2] A.E. dos Santos. As principais linhas da biologia forense e como auxiliam na resolução de crimes. *Rev. Bras. Crim.*, **7**, 12-20, 2018.
- [3] C.H. Calazans, S.M. Calazans. Ciência forense: das origens à ciência forense computacional. Dissertação de mestrado. Laboratório de Sistemas Integrados – Escola Politécnica – USP, 200).
- [4] H.M. Coyle *et al.* Forensic botany: using plant evidence to aid in forensic death investigation. *Croat Med J* **46**, 606-612, 2005.
- [5] S.R. Alves. Toxicologia forense e saúde pública: Desenvolvimento e avaliação de um sistema de informações como potencial ferramenta para a vigilância e monitoramento de agravos decorrentes da utilização de substâncias químicas. Tese de Doutorado, FIOCRUZ, 2005.
- [6] B. Madea. Histology in forensic practice. *Forensic Sci, Med and Pathology* **8**, 64-65, 2012.
- [7] M.R. Gomes. Da breve análise criminológica do transgressor à classificação das manchas de sangue por meio da hematologia forense reconstrutora. Monografia de pós-graduação, Unilavras, 2019.
- [8] D.C. Lehman. Forensic microbiology. *Clinical microbiology newsletter* **36**, 49-54, 2014.
- [9] M. Oliveira, A. Amorin. Microbial forensics: new breakthroughs and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**, 10377-10391, 2018.
- [10] E.V. Spagnolo *et al.* Forensic microbiology applications: A systematic review. *Legal Medicine* **36**, 73-80, 2019.
- [11] E.T. Rother. Revisão sistemática X revisão narrativa. *Acta Paulista de Enfermagem* **20**, 5-6, 2007.
- [12] P. Fachone, L. Velho. Ciência forense: interseção justiça, ciência e tecnologia. *Rev Tec e Sociedade* **3**, 139-161, 2007.
- [13] V. da Silva Leita *et al.* Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense. *Derecho y Cambio Social* **10**, 21, 2013.
- [14] P.S. Keim, B. Budowle, J. Ravel. Microbial forensic investigation of th anthrax-letter attacks. *Microbial Forensics* 15-25, 2011.
- [15] U.S. Department of Justice. Amerithrax investigative summary, 2010. Retirado em 08/10/2020, de <https://www.justice.gov/archive/amerithrax/docs/amx-investigative-summary.pdf>
- [16] M. Chimutsa *et al.* Soil fungal community shift evaluation as a potential cadaver decomposition indicator. *Forensic Sci Int* **257**, 155-159, 2015.
- [17] E.S. Spagnolo, C.S.C. Mondello, S. Zerbo, L. Milone, A. Argo. Forensic microbiology applications: A systematic review. *Legal Medicine* **36**, 73-80, 2019.
- [18] J.T. Hampton-Marcella, P. Larsena, T. Antona, L. Cralle, N. Sangwan, S. Lax, N. Gottel, M. Salas-Garcia, C. Youn, G. Duncan, J.V. Lopez, J.A. Gilbert. Detecting personal microbiota signatures at artificial crime scenes. *Forensic Science International* **313**, 110351, 2020.
- [19] N. Fierer *et al.* Forensic identification using skin bacterial communities. *PNAS* **107**, 6477-6481, 2010.
- [20] S. Lax *et al.* Forensic analysis of the microbiome of phones and shoes. *Microbiome* **3**, 1-8, 2015.
- [21] H. Goga. Comparison of bacterial DNA profiles of footwear insoles and soles of feet for the forensic discrimination of footwear owners. *Int J Leg Med* **126**, 815-823, 2012.
- [22] S.Y. Lee *et al.* Forensic analysis using microbial community between skin bacteria and fabrics. *J Toxicol Environ Health Sci* **8**, 263-270, 2016.
- [23] Tridico *et al.* Metagenomic analyses of bacteria on human hairs: a qualitative assessment for applications in forensic Science. *Investigative Genetic* **5**, 16, 2014.
- [24] J. Parkhill. What has high-throughput sequencing ever done for us? *Nat Rev Microbiology* **11(10)**, 664-665, 2013.
- [25] G.T. Javan, S.J. Finley, Z. Abidin, J.G. Mulle. The thanatomicrobiome: a missing piece of the microbial puzzle of death. *Front. Microbiol.* 1-7, 2016.
- [26] S. Christoffersen. The importance of microbiological testing for establishing cause of death in 42 forensic autopsies. *Forensic Sci Int* **250**, 27-32, 2015.
- [27] S.J. Finley, M.E. Benbow, T.G. Javan. Microbial communities associated with human decomposition and their potential use as postmortem clocks. *Int J Legal Med* **129**, 623-632, 2015.
- [28] J.L. Metcalf. Estimating the postmortem interval using microbes: Knowledge gaps and a path to technology adoption. *Forensic Science International: Genetics* **38**, 211-218, 2019.
- [29] W.A. Kodama, M.S. Zhenjiang Xu, J.L. Metcalf, S.J. Song, N. Harrison, R. Knight, D.O. Carter, C.B. Happy. Trace Evidence Potential in Postmortem Skin Microbiomes: From Death Scene to Morgue. *Forensic Sci*, **64(3)**, 791-798, 2019.
- [30] J.L. PEchal, C.J. Schmidt, H.R. Jordan, M.E. Benbow. A large-scale survey of the postmortem human microbiome, and its potential to provide insight into the living health condition. *SCientific REPorTS* **8**, 5724, 2018.
- [31] T.H. Clarke, A. Gomez, H. Singh, K.E. Nelson, L.M. Brinkac. Integrating the Microbiome as a Resource in the Forensics Toolkit. *Forensic Sci. Int. Genet.* **30**, 141-147, 2017.
- [32] M.G. Garcia, M.D. Pérez-Cárceles, E. Osuna, I. Legaz. Impact of the Human Microbiome in Forensic Sciences: A Systematic Review. *Appl. Environ. Microbiol.*: **86**, 1420-1451, 2020.
- [33] S.E. Schmedes, A.E. Woerner, B. Budowle. Forensic Human Identification Using Skin Microbiomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, E01672-17, 2017.
- [34] B. Moitas, I.M. Caldas, B. Sampaio-Maia. Forensic microbiology and bite marks: a systematic review. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology* **40(2)**, 2219-6749, 2022.
- [35] M.A. Barbosa *et al.* Aplicações de fungos em estudos forenses no processo de degradação cadavérica. *Saúde & Amb em Rev* **7**, 10-18, 2012.
- [36] M. Tibbett, D.O. Carter. Mushrooms and taphonomy: the fungi that mark woodland graves. *Mycologist* **17**, 20-24, 2003.
- [37] D.L. Hawksworth, P.E. Wiltshire. Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Sci Int* **206**, 1-11, 2011.
- [38] D.L. Hawksworth, P.E. Wiltshire. Forensic mycology: current perspectives. *Research and Reports in Forensic Med Sci* **5**, 75-83, 2015.
- [39] M. Hitosugi *et al.* Fungi can be a useful forensic tool. *Legal Med* **8**, 240-242, 2006.
- [40] R.E. Moreira Filho. Micologia Forense: a dinâmica da microbiota fúngica na investigação do período post

mortem. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2008.

[41] J.J.C. Sidrim, R.E. Moreira-Filho, R.A. Cordeiro, M.F.G. Rocha, E.P. Caetano, A.J. Monteiro, R.S.N. Brilhante. Fungal microbiota dynamics as a postmortem investigation tool: focus on *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* species. *Journal of Applied Microbiology*, **108(5)**, 1751-1756, 2010.

[42] M.C. Tranchida *et al.* Soil Fungi: Their Potential use as a Forensic Tool. *Journal of Forensic Sci* **59**, 785-789, 2014.

[43] S. di Piazza, M. Zotti, R. Barranco, G. Cecchi, G. Greco, F. Ventura. Post-mortem fungal colonization pattern during 6 weeks: Two case studies. *Forensic Science International* **289**, e18-e23, 2018.

[44] S. Karadayi. Assessment of the link between evidence and crime scene through soil bacterial and fungal microbiome: a mock case in forensic study. *Forensic Science International* **329**, 111060, 2021.

[45] J. Wójcik, M. Tomsia, A. Drzewiecki, R. Skowronek. Thanatobiome—State of the art and future directions. *Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology* **60**, 21-29, 2021.

[46] M.C. Beckett, S. Tucker, A.Z. Ozsoy, M. Connor. Identification of fungi found on desiccated human remains in an arid outdoor environment. *J Forensic Sci* **67**, 2048-2054, 2022.

[47] M.R.S. Tavares. Caracterização de fungos filamentosos e leveduras isolados de ossadas e cadáveres humanos e seu potencial forense. Monografia, UFPR, 2022.