



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Mikaella Lucia Felix Formiga

Micologia forense: uma revisão sistemática e uma nova proposta de metodologia de isolamento e identificação de fungos associados à estimativa do intervalo *post-mortem* (IPM)

Rio de Janeiro

2024

Mikaella Lucia Felix Formiga

Micologia forense: uma revisão sistemática e uma nova proposta de metodologia de isolamento e identificação de fungos associados à estimativa do intervalo *post-mortem* (IPM)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F725 Formiga, Mikaella Lucia Felix.

Micologia Forense: uma revisão sistemática e uma nova proposta de metodologia de isolamento e identificação de fungos associados à estimativa de intervalo *post-mortem* (IPM) / Mikaella Lucia Felix Formiga. – 2024.
106 f.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld

Dissertação (Mestrado profissional) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. Criminalística – Métodos – Teses. 2. Micologia – Métodos – Teses. 3. Técnicas microbiológicas – Métodos. 4. Ciências forenses. I. Neufeld, Paulo Murillo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 579.6:343.98

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mikaella Lucia Felix Formiga

Micologia forense: uma revisão sistemática e uma nova proposta de metodologia de isolamento e identificação de fungos associados à estimativa do intervalo *post-mortem* (IPM)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de dezembro de 2024.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld (Orientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Ludmila Alem
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Aos meus pais, Janaina e Marcos, aos meus irmãos, Marcello e Júnior, aos mestres e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Janaina e Marcos, por todo amor que me dedicaram. Não há palavras que expresse o quão vocês são preciosos para mim. Minha conquista sempre será dedicada a vocês.

Aos meus irmãos mais novos, Marcos Junior e Marcello, por estarem presentes na minha vida. Sei que posso contar com vocês, assim com vocês podem contar comigo.

A todos os amigos que entraram na minha vida e deixaram uma marca. Principalmente as minhas amigas de graduação, Ana Beatriz e Ana Noemi, que deixaram de ocupar o cargo de amigas e hoje em dia são as irmãs que eu sempre pedi a Deus.

Ao meu namorado, Danilo, por todo seu amor e apoio.

A todos os professores que fizeram parte da minha jornada e contribuíram para a pessoa e profissional que me tornei. Seus ensinamentos vivem e reverberam em mim.

Ao meu orientador Paulo Murillo Neufeld, pela atenção, paciência, suporte durante todo o desenvolvimento deste trabalho e por toda a oportunidade que me foi confiada.

A todos os alunos que tive o prazer de passar um pouco do meu conhecimento e orientação. Sei que aprendi com eles muito mais do que ensinei.

Aos queridos Biomédicos, Matheus Fallett e Jean Moreira, pelo empenho como terceiros avaliadores da revisão sistemática. Os dois sempre com muito profissionalismo e carinho, colaborando e ajudando do início ao fim da pesquisa.

Ao Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por todo ensinamento que me foi proporcionado e por acreditar que meu projeto resultaria nesta dissertação.

A todas as amizades feitas no Mestrado, em especial minha amiga Rosane que foi um anjo em forma de mulher. Obrigada por todo o seu carinho e zelo.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho, obrigada.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se
cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

RESUMO

FORMIGA, Mikaella Lucia Felix. **Micologia Forense: uma revisão sistemática e uma nova proposta de metodologia de isolamento e identificação de fungos associados à estimativa de intervalo *post-mortem* (IPM)**. 2024. 106 f. Dissertação (Mestrado profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Os fungos são, majoritariamente, decompositores, estando presentes durante todo o processo de putrefação, e apresentam esporos aerovagantes, que permitem, a esses organismos, acesso aos mais diversos e extremos ambientes. Além disso, o crescimento das colônias fúngicas ocorrem de maneira radial e centrífuga, permitindo presumir o tempo necessário do seu desenvolvimento, o que pode ser utilizado na estimativa do intervalo *post-mortem* (IPM). Neste sentido, a micologia forense, com todo o seu potencial metodológico, surge como uma possível ferramenta para a área forense. No entanto, devido a um grande desconhecimento em relação a biologia fúngica em um ambiente forense, os fatores que podem acelerar ou retardar o desenvolvimento fúngico e suas possíveis aplicações para auxiliar nas resoluções jurídicas, mesmo que sejam comumente encontrados em cenas de crime, não raramente, são descartados como possíveis evidências, pois os profissionais da área forense não sabem como aproveitá-la. Assim, pelo exposto, o presente trabalho foi dividido em 2 partes. A primeira levou a proposição de sistematizar as evidências científicas relacionadas ao uso da micologia no âmbito criminal. Para isso, realizou-se uma revisão sistemática, buscando as bases de dados PUBMED, EMBASE, Web of Science, LILACs e OpenGrey, utilizando MeSH e termos livres com base na estratégia PICO (P: população; I: Intervenção; C: comparação; e O: desfecho), para artigos publicados até fevereiro de 2024 sobre a aplicação forense de fungos encontrados em cadáveres humanos. Os resultados nas bases de dados recuperaram 106 artigos, que, por meio do gerenciador Rayyan QCRI, 13 artigos foram selecionados. Após a leitura na íntegra e a avaliação da qualidade metodológica pelo protocolo do Instituto Joanna Briggs (JBI), 6 artigos foram incluídos na revisão. Os resultados indicam que a micologia é uma ferramenta auxiliar que pode ser aproveitada nos estudos forenses desde que os profissionais tenham um conhecimento mínimo sobre a biologia fúngica e as técnicas microbiológicas que devem ser aplicadas. E a segunda parte do trabalho foi avaliar o crescimento fúngico em diferentes substratos a fim de desenvolver um protocolo para a confecção de meios de cultura mais adequada para a área forense, visto que por ser uma área recente, é necessário otimizar e padronizar os métodos de análise da micobiota e determinar fatores que podem influenciar os resultados. Para isso, inoculou-se fungos ubiqüitários em meios já estabelecidos na micologia médica e em meios elaborados para mimetizar o substrato cadavérico a partir do fígado de frango. A análise do crescimento fúngico foi realizada por meio de leituras visuais, medições com paquímetro e análise no ImageJ, procedidas durante 14 dias após a inoculação desses fungos. Inicialmente, observou-se que houve diferenças na velocidade do crescimento fúngico, havendo esporulação mais rápida nos meios constituídos por extrato vegetal que nos constituídos de proteína animal, sugerindo que o meio de cultura é um interferente que precisa ser considerado na análise do IPM.

Palavras-chaves: Crime. Micologia. Ciências forenses. Cadáver. Colônias fúngicas. Meios micológicos

ABSTRACT

FORMIGA, Mikaella Lucia Felix. *Forensic mycology: a systematic review and a new proposal for a methodology for the isolation and identification of fungi associated with the estimation of post-mortem interval (PMI)*. 2024. 106 f. Dissertação (Mestrado profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Fungi are mostly decomposers, being present throughout the putrefaction process, and have aerovagant spores, which allow these organisms access to the most diverse and extreme environments. In addition, fungal colonies grow radially and centrifugally, allowing us to assume the time required for their development, which can be used to estimate the post-mortem interval (IPM). In this sense, forensic mycology, with all its methodological potential, emerges as a possible tool for the forensic area. However, due to a great lack of knowledge regarding fungal biology in a forensic environment, the factors that can accelerate or delay fungal development and their possible applications to assist in legal resolutions, even though they are commonly found at crime scenes, are often discarded as possible evidence, since forensic professionals do not know how to take advantage of them. Therefore, based on the above, this work was divided into 2 parts. The first led to the proposal to systematize the scientific evidence related to the use of mycology in the criminal context. To this end, a systematic review was carried out, searching the PUBMED, EMBASE, Web of Science, LILACs and OpenGrey databases, using MeSH and free terms based on the PICO strategy (P: population; I: intervention; C: comparison; and O: outcome), for articles published until February 2024 on the forensic application of fungi found in human cadavers. The results in the databases retrieved 106 articles, of which, through the Rayyan QCRI manager, 13 articles were selected. After reading in full and assessing the methodological quality using the Joanna Briggs Institute (JBI) protocol, 6 articles were included in the review. The results indicate that mycology is an auxiliary tool that can be used in forensic studies as long as professionals have a minimum knowledge of fungal biology and the microbiological techniques that should be applied. The second part of the study was to evaluate fungal growth on different substrates in order to develop a protocol for the production of culture media that is more suitable for forensic science. Since this is a recent field, it is necessary to optimize and standardize mycobiota analysis methods and determine factors that may influence the results. To this end, ubiquitous fungi were inoculated into media already established in medical mycology and into media designed to mimic cadaveric substrates from chicken liver. Fungal growth was analyzed by means of visual readings, caliper measurements, and ImageJ analysis, carried out for 14 days after inoculation of these fungi. Initially, it was observed that there were differences in the speed of fungal growth, with faster sporulation in media containing plant extract than in those containing animal protein, suggesting that the culture medium is an interfering factor that needs to be considered in the IPM analysis.

Keywords: Crime, mycology, forensic sciences, cadaver, fungal colonies, mycological media.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Crescimento característico das colônias fúngicas.....	32
Figura 2 –	Estimativa do intervalo <i>post-mortem</i>	38
Figura 3 –	Diagrama de fluxo PRISMA.....	50
Quadro 1 -	Técnicas utilizadas em cada artigo	62
Figura 4 –	Preparo dos meios a base de peça de açougue.....	69
Figura 5 –	Esterilização dos meios a base de extrato proteico.....	70
Figura 6 –	Inóculo e medição do diâmetro das colônias fúngicas.....	71
Figura 7 –	Análise das fotografias com o ImageJ.....	73
Figura 8 –	Confirmação das cepas fúngicas a partir da macroscopia das culturas...	75
Figura 9 –	Confirmação das cepas fúngicas a partir da micromorfologia dos fungos filamentosos por meio da técnica de microcultivo.....	76
Figura 10 –	Confirmação da cepa fúngica leveduriforme <i>Candida albicans</i>	77
Figura 11 –	Crescimento fúngico nas placas dos meios de cultura que não foram filtrados antes de verter nas placas de Petri.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Total de fungos identificados nos artigos.....	59
Gráfico 2 –	Estruturas somáticas das cepas fúngicas relatadas.....	59
Gráfico 3 –	Crescimento fúngico medido em diâmetro do <i>Aspergillus fumigatus</i> ao longo de 14 dias.....	83
Gráfico 4 –	Crescimento fúngico medido em área do <i>Aspergillus fumigatus</i> ao longo de 14 dias.....	84
Gráfico 5 –	Crescimento fúngico medido em diâmetro do <i>Curvularia</i> sp. ao longo de 14 dias.....	86
Gráfico 6 –	Crescimento fúngico medido em área do <i>Curvularia</i> sp. ao longo de 14 dias.....	87
Gráfico 7 –	Crescimento fúngico medido em diâmetro do <i>Rhizopus</i> sp. ao longo de 14 dias.....	89
Gráfico 8 –	Crescimento fúngico medido em área do <i>Rhizopus</i> sp. ao longo de 14 dias.....	90
Gráfico 9 –	Crescimento fúngico medido em diâmetro do <i>Candida albicans</i> ao longo de 14 dias.....	92
Gráfico 10 –	Crescimento fúngico medido em área do <i>Candida albicans</i> ao longo de 14 dias.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sintaxe utilizada em cada uma das bases eletrônicas para realização das buscas por artigos.....	43
Tabela 2 –	Análise de risco de viés	51
Tabela 3 –	Síntese da informação obtida nos artigos em análise.....	52
Tabela 4 –	Resultado visual dos meios de cultura a base de extrato proteico.....	79
Tabela 5 –	Resultado visual do crescimento colonial de <i>Aspergillus fumigatus</i> em meios com diferentes processos de esterilização.....	80
Tabela 6 –	Resultado visual do crescimento colonial de <i>Curvularia</i> sp. em meios com diferentes processos de esterilização.....	80
Tabela 7 –	Resultado visual do crescimento colonial de <i>Rhizopus</i> sp. em meios com diferentes processos de esterilização.....	81
Tabela 8 –	Resultado visual do crescimento colonial de <i>Candida albicans</i> em meios com diferentes processos de esterilização.....	81
Tabela 9 –	Análise da macromorfologia e micromorfologia de <i>Aspergillus fumigatus</i> em diferentes meios de cultura.....	82
Tabela 10 –	Macroscopia das culturas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	85
Tabela 11 –	Macroscopia das culturas de <i>Curvularia</i> spp.....	88
Tabela 12 –	Macroscopia das culturas de <i>Rhizopus</i> spp.....	91
Tabela 13 –	Macroscopia e microscopia das culturas de <i>Candida albicans</i>	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Ágar Infusão de Fígado
AHF	Ágar Homogenato de Fígado
BHIA	<i>Brin Heart Infusion Agar</i> (Ágar Infusão Cérebro-Coração)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
DECS	Descritores em Ciências da Saúde
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
IPM	Intervalo <i>Post-Mortem</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaciador Transcrito Interno)
JI	<i>Joanna Briggs Institute</i> (Instituto Joanna Briggs)
LILACs	<i>Latin American and Caribbean Health Sciences Literature</i> (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde)
LSU	<i>Large subunit</i> (Subunidade Grande)
MALD-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i> (Laser de Dessorção Assistida por Matriz Ionização-Tempo de Voo)
MESH	<i>Medical Subject Headings</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Sequenciamento de Próxima Geração)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (Ágar Batata Dextrosado)
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Metanalysis</i>
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Ágar Sabouraud Dextrosado)
SBN	<i>Sequence-Based Nomenclature</i> (Nomenclatura Baseada em Sequenciamento)
SSU	<i>Small subunit</i> (Pequena subunidade)

LISTA DE SÍMBOLOS

NH ₃	Amônia
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Grama
°C	Grau Celsius
KOH	Hidróxido de Potássio
h	Hora
%	Porcentagem
+	Mais
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
min.	Minuto

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	OBJETIVOS	40
1.1	Objetivo geral.....	40
1.2	Objetivo específicos.....	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Pergunta chave.....	41
2.2	Estratégia de busca.....	41
2.3	Critério de inclusão.....	47
2.4	Critério de exclusão.....	47
2.5	Seleção de artigos.....	47
2.6	Estratégia para análises de dados.....	47
2.7	Avaliação do risco de viés.....	48
3	RESULTADOS	49
3.1	Fungos estão presentes nos cadáveres humanos.....	57
3.2	Não há padronização nas coletas e processamentos laboratoriais.....	57
3.3	Fungos hialinos são os mais encontrados em cadáveres humanos.....	58
3.4	O impacto do ambiente e o estudo de decomposição interferem na microbiota <i>post-mortem</i>	60
3.5	Fungos patogênicos não foram encontrados em cadáveres humanos.....	61
3.6	A micologia forense utiliza técnicas recicladas da micologia médica.....	62
3.7	O congelamento das amostras fúngicas interfere na diversidade fúngico presente.....	63
3.8	As condições <i>perimortem</i> podem influenciar na microbiota <i>post-mortem</i>	64
4	DISCUSSÃO.....	65
5	MATERIAL E MÉTODOS	67
5.1	Amostras fúngicas	67
5.2	Meios de cultura usuais em laboratório de micologia.....	67
5.3	Meios de cultura a base de fígado de frango.....	67

5.4	Esterilização dos meios de cultura a base de fígado de frango_.....	69
5.5	Inóculo fúngico.....	70
5.6	Medição do diâmetro e área das colônias fúngicas.....	71
6	RESULTADOS	74
6.1	AHF e AIF precisam ser filtrados antes de serem vertidos nas placas de Petri.....	77
6.2	Diferentes processos de esterilização não interferem significativamente o crescimento fúngico nos meios de cultura.....	81
6.3	A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	81
6.4	A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de <i>Curvularia</i> spp...	86
6.5	A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de <i>Rhizopus</i> spp.....	88
6.6	A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de <i>Candida albicans</i>.....	91
7	DISCUSSÃO	94
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	96
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE – Ficha de registro de dados da revisão sistemática.....	104
	ANEXO A - JBI critical appraisal checklist for systematic reviews and research syntheses original.....	105
	ANEXO B - lista de verificação de avaliação crítica do joanna briggs institute (JBI) para revisões sistemáticas e sínteses de pesquisas adaptado.....	106

INTRODUÇÃO

O impacto dos fungos na economia humana

Os fungos têm uma importância profunda e multifacetada na economia humana, desempenhando papéis essenciais em áreas como agricultura, biotecnologia, indústria alimentícia e farmacêutica e saúde pública. Sua versatilidade e diversidade biológica e funcional e capacidade de interagir com outros organismos e substratos de maneira única, os tornam indispensáveis para a produção de bens e serviços, bem como para a resolução de desafios ambientais e sustentabilidade. Além disso, as micoses humanas e animais e a micologia forense destacam a relevância dos fungos no contexto social e jurídico, ampliando sua influência na economia e na ciência (1).

Na agricultura, os fungos têm um impacto duplo. Por um lado, fungos micorrízicos, como *Glomus spp.*, formam associações simbióticas com raízes de plantas, promovendo a absorção de nutrientes e aumentando a resistência a estresses ambientais. Esses fungos são utilizados em biofertilizantes, contribuindo para a agricultura sustentável. Por outro lado, fungos fitopatogênicos, como *Fusarium* e *Aspergillus*, causam grandes perdas econômicas em culturas agrícolas importantes, além de produzirem micotoxinas que contaminam alimentos e ameaçam a saúde humana e animal. A gestão eficaz desses organismos é essencial para garantir a segurança alimentar e mitigar prejuízos econômicos (2,3).

Os fungos também têm um impacto significativo na biotecnologia e no manejo ambiental. Eles produzem enzimas que são amplamente utilizadas na indústria, como celulasas e ligninases, essenciais para o processamento de alimentos, produção de biocombustíveis e reciclagem de materiais. Além disso, os fungos são agentes-chave em processos de biorremediação, capazes de degradar compostos tóxicos, como pesticidas e hidrocarbonetos, contribuindo para a recuperação de ecossistemas contaminados. Essa capacidade única destaca os fungos como aliados estratégicos na busca por soluções sustentáveis para desafios globais (2,3).

Na indústria alimentícia, os fungos são fundamentais para a produção de uma ampla variedade de alimentos e bebidas. Leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, desempenham um papel central na fermentação de pão, cerveja e vinho, processos que transformam carboidratos em etanol e dióxido de carbono, gerando produtos de alto valor comercial. Além

disso, fungos filamentosos, como *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*, são responsáveis pela maturação e desenvolvimento de queijos especiais, enquanto *Aspergillus oryzae* é amplamente utilizado na fermentação de alimentos asiáticos, como molho de soja. Esses exemplos não apenas demonstram a importância dos fungos na economia global, mas também destacam sua capacidade de agregar valor cultural e comercial aos produtos alimentícios (2,3).

A indústria farmacêutica também se beneficia amplamente dos fungos, especialmente pela sua capacidade de produzir compostos bioativos. A penicilina, descoberta a partir de *Penicillium notatum*, revolucionou a medicina ao inaugurar a era dos antibióticos, salvando milhões de vidas. Outros compostos, como as estatinas produzidas por *Aspergillus terreus*, são essenciais para o controle do colesterol, enquanto a ciclosporina, derivada de *Tolypocladium inflatum*, é indispensável na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. A pesquisa em micologia continua a revelar novos compostos antifúngicos, imunossupressores e antitumorais, reforçando a importância econômica e social dos fungos na medicina moderna (1).

No contexto da saúde, as micoses humanas e animais representam um desafio significativo, tanto do ponto de vista médico quanto econômico. Infecções fúngicas superficiais, como dermatofitoses causadas por *Trichophyton* e *Microsporum*, são comuns e frequentemente associadas a custos elevados de tratamento e controle. Micoses sistêmicas, como aspergilose e criptococose, são mais graves e podem ser fatais, especialmente em pacientes imunocomprometidos. O aumento de infecções fúngicas resistentes a medicamentos, como candidíase causada por *Candida auris*, representa uma preocupação emergente para sistemas de saúde em todo o mundo. Em animais, infecções fúngicas em espécies domésticas e de criação, como mastite fúngica em bovinos, geram prejuízos econômicos diretos e indiretos, afetando a produção e a qualidade dos produtos de origem animal (1,4).

Por fim, os fungos também desempenham papéis significativos na micologia forense, uma disciplina emergente que utiliza a biologia dos fungos para resolver casos criminais e cíveis. Fungos encontrados em cadáveres ou cenas de crime podem fornecer informações cruciais sobre o intervalo *post-mortem* (IPM), condições ambientais e possíveis locais de origem. Espécies de fungos, como *Aspergillus* e *Cladosporium*, frequentemente presentes em cadáveres em decomposição, podem ser usadas como indicadores temporais e geográficos, ajudando a reconstruir cenários criminais. Além disso, fungos encontrados em solos, roupas ou objetos podem conectar vítimas ou suspeitos a locais específicos, oferecendo evidências robustas em investigações judiciais. A micologia forense destaca não apenas a relevância

científica dos fungos, mas também seu impacto no sistema de justiça e na economia das investigações criminais (1,4).

Evolução dos organismos fúngicos

A história da vida na Terra está associada a transformações químicas e biológicas que moldaram o planeta ao longo de bilhões de anos. Estima-se que acerca de 3,8 bilhões de anos, os primeiros organismos unicelulares surgiram nos oceanos primordiais, impulsionados pela combinação de moléculas orgânicas, fontes de energia geotérmica e uma atmosfera inicialmente rica em dióxido de carbono, metano e nitrogênio (5). Esses organismos, provavelmente procariontes anaeróbicos, sobreviveram em um ambiente sem oxigênio livre, utilizando processos metabólicos simples para extrair energia de compostos disponíveis (6). Esses primeiros organismos formaram a base para a evolução de formas de vida mais complexas, incluindo os ancestrais dos fungos.

Um marco importante na história da vida Terra foi a “Grande Oxidação” ou “Grande Oxigenação”, ocorrida há aproximadamente 2,5 bilhões de anos, quando organismos fotossintetizantes, como cianobactérias, começaram a liberar oxigênio molecular na atmosfera (7). Esse evento transformou drasticamente a composição atmosférica e química da Terra, permitindo o surgimento de organismos aeróbios (8). No entanto, também trouxe desafios para muitas espécies anaeróbicas, que foram extintas ou forçadas a se adaptar (9). Foi nesse ambiente em transformação que os ancestrais dos fungos começaram a evoluir. O aumento do oxigênio favoreceu o metabolismo aeróbio, que é mais eficiente na produção de energia, possibilitando a evolução de formas eucarióticas mais complexas (10).

A transição de organismos unicelulares para pluricelulares foi um processo evolutivo lento. Essa mudança ocorreu por meio de interações cooperativas entre células que passaram a se especializar e formar estruturas multicelulares (11). Dentro dessa narrativa, os fungos emergiram como eucariontes únicos no supergrupo Opisthokonta, que inclui também os animais e seus parentes protistas (12). Evidências moleculares e fósseis indicam que os fungos divergiram dos animais há cerca de 1 a 1,5 bilhões de anos, quando organismos multicelulares começaram a surgir em novos nichos ecológicos (13).

Efetivamente, os registros fósseis têm ajudado à ciência a compreender melhor a complexa evolução fúngica e seu intrincado papel como decompositores nos diferentes

ecossistemas da Terra. Os fósseis mais antigos atribuídos a fungos datam de cerca de 1 bilhão de anos e foram encontrados em rochas sedimentares do Canadá (14). Esses fósseis, como *Ourasphaira giraldae*, incluem hifas e esporos, indicando que os fungos primitivos já possuíam organização filamentosa e mecanismos de reprodução que favoreciam sua dispersão e sobrevivência (15). Durante o Pré-Cambriano, os fungos desempenharam papéis cruciais na decomposição de matéria orgânica nos oceanos primitivos, ajudando a reciclar nutrientes em ecossistemas anaeróbicos e aeróbicos emergentes (16).

Com a transição para ecossistemas terrestres, os fungos consolidaram sua função como os principais decompositores da matéria orgânica. Durante o Siluriano, cerca de 420 milhões de anos atrás, os fungos estabeleceram associações simbióticas com as primeiras plantas terrestres, formando micorrizas (17). Essas interações permitiram que plantas primitivas colonizassem solos pobres em nutrientes, enquanto os fungos recebiam compostos de carbono sintetizados pela fotossíntese (17). Fósseis de micorrizas arbusculares encontrados em raízes fossilizadas dessa época confirmam a importância dessas relações para a evolução das plantas e a complexificação dos ecossistemas terrestres (16).

No Devoniano, os fungos continuaram a diversificar-se e desempenharam papéis fundamentais em ecossistemas terrestres. Um exemplo notável é o *Prototaxites*, um fóssil gigante que se acredita ser um fungo e que dominava a paisagem terrestre há cerca de 400 milhões de anos (16). Esses organismos macroscópicos, com até 8 metros de altura, exemplificam como os fungos eram essenciais na reciclagem de nutrientes em ambientes ainda em desenvolvimento (15). Estudos isotópicos indicam que o *Prototaxites* era heterotrófico, reforçando sua função como decompositor (16).

Os fungos sapróbios, em particular, são essenciais para os ecossistemas devido à sua capacidade de decompor matéria orgânica, incluindo compostos altamente resistentes como lignina e celulose, encontrados em plantas lenhosas (12). Durante o Carbonífero (359-299 milhões de anos atrás), a evolução de enzimas ligninolíticas pelos fungos basidiomicetos permitiu que eles desempenhassem um papel essencial na degradação de plantas vasculares, reciclando carbono e outros nutrientes de volta para o solo e a atmosfera (13). A ausência de atividade ligninolítica em larga escala durante partes do Carbonífero é considerada uma das razões para a formação massiva de depósitos de carvão, enquanto os fungos evoluíram para superar essas barreiras químicas no final desse período (16).

No Permiano-Triássico, durante a maior extinção em massa da história da Terra, os fungos prosperaram como decompositores em ecossistemas colapsados, reciclando matéria orgânica acumulada em grande escala. Camadas sedimentares desse período apresentam

abundância de esporos fósseis, indicando que os fungos sapróbios tiveram um papel proeminente na recuperação dos ecossistemas (16). À medida que os ecossistemas se recuperaram e novos organismos emergiram, os fungos continuaram a diversificar suas estratégias de decomposição e adaptação, formando novas interações simbióticas e parasíticas (15).

Os fósseis preservados em âmbar do Cretáceo e do Eoceno, bem como biomarcadores moleculares encontrados em sedimentos, fornecem uma visão detalhada sobre a diversidade de fungos ao longo do tempo (16). Âmbar contendo hifas e esporos demonstra interações ecológicas complexas entre fungos e insetos, plantas e outros organismos (15). Essas descobertas reforçam o papel contínuo dos fungos como recicladores de nutrientes e catalisadores da complexidade ecológica.

Os fungos, como heterótrofos obrigatórios, dependem de matéria orgânica externa para obter carbono e energia. Essa característica os coloca no centro da dinâmica dos ecossistemas, especialmente no ciclo do carbono. Ao longo de bilhões de anos, os fungos têm desempenhado um papel essencial na manutenção do equilíbrio biogeoquímico da Terra, conectando passado e presente através de sua função como os principais decompositores da biosfera (16).

O papel dos fungos nos ciclos biogeoquímicos

Os fungos são os principais decompositores no ecossistema terrestre, desempenhando um papel essencial nos ciclos biogeoquímicos, particularmente nos ciclos do carbono, nitrogênio e fósforo. Sua habilidade de decompor matéria orgânica, combinada com sua capacidade enzimática excepcional, faz deles os catalisadores mais importantes para a reciclagem de nutrientes essenciais para a vida (18). O impacto dessa decomposição vai além da liberação de nutrientes; ele regula o sequestro e a liberação de carbono, contribui para a disponibilidade de nitrogênio e fósforo para outros organismos e molda a dinâmica ecológica global (19).

No ciclo do carbono, os fungos são críticos para a transformação de matéria orgânica complexa em CO₂ e compostos mais simples, que podem ser reutilizados por plantas e outros organismos fotossintetizantes. Os fungos, especialmente os sapróbios, secretam um arsenal de enzimas extracelulares, como celulasas, hemicelulasas e ligninases, que permitem a degradação de compostos como celulose, hemicelulose e lignina, encontrados nas paredes

celulares das plantas (20). A lignina, em particular, é um dos compostos orgânicos mais resistentes à degradação. Apenas fungos específicos, como os basidiomicetos e alguns ascomicetos, possuem a capacidade de degradar lignina eficientemente por meio de enzimas oxidativas, como peroxidases e laccases (21). Este processo não apenas recicla carbono, mas também influencia a quantidade de carbono que permanece no solo ou é liberada na atmosfera, regulando o equilíbrio climático global (22).

Além disso, os fungos desempenham papéis cruciais no ciclo do nitrogênio. Eles decompõem proteínas e outros compostos nitrogenados em formas inorgânicas, como NH_3 , através de enzimas proteolíticas, como proteases e peptidases (23). Este nitrogênio inorgânico pode então ser assimilado por plantas ou convertido em outras formas por microrganismos do solo, como nitratos e nitritos, disponíveis para o uso em redes tróficas.

A capacidade dos fungos de armazenar nitrogênio em forma de aminoácidos ou quitina em suas paredes celulares também ajuda a regular a disponibilidade deste elemento nos ecossistemas (24). Essa interação complexa entre fungos e microrganismos procariontes, como as bactérias fixadoras de nitrogênio, é fundamental para o ciclo de nutrientes em ecossistemas terrestres e aquáticos (25).

No ciclo do fósforo, os fungos micorrízicos desempenham um papel especialmente importante. Através de associações simbióticas com raízes de plantas, eles aumentam a absorção de fósforo do solo, frequentemente na forma de fosfatos insolúveis (26). Os fungos liberam ácidos orgânicos, como ácido oxálico, e enzimas fosfatases, que solubilizam o fósforo mineral, tornando-o acessível para as plantas (27). Essas interações simbióticas permitem que as plantas prosperem em solos pobres em nutrientes, contribuindo significativamente para a produtividade primária em diversos ecossistemas terrestres (12).

A eficiência dos fungos na decomposição também se deve à sua notável plasticidade metabólica e adaptabilidade. Eles possuem mecanismos altamente eficientes para produzir e modular enzimas extracelulares em resposta às características do substrato disponível. Por exemplo, em madeira em decomposição, os fungos secretam enzimas específicas para degradar celulose e lignina, enquanto, em restos de matéria orgânica nitrogenada, aumentam a produção de proteases (28). A regulação da atividade enzimática é mediada por sinais moleculares e ambientais, como a disponibilidade de oxigênio, a presença de substratos específicos e a competição com outros organismos decompositores (29).

A importância dos fungos no equilíbrio ecológico também é evidente em sua interação com o solo. Ao reciclar nutrientes, eles promovem a formação de matéria orgânica estável, conhecida como húmus, que é fundamental para a retenção de água e nutrientes no solo (23).

Além disso, os fungos liberam dióxido de carbono como subproduto de sua respiração, contribuindo para o ciclo de carbono atmosférico. Esse CO₂ é reciclado por organismos fotossintetizantes, fechando o ciclo e mantendo o fluxo contínuo de energia e matéria no ecossistema (29).

Os impactos da atividade decompositora dos fungos são profundos em um contexto global. Estima-se que os fungos sejam responsáveis por decompor até 70% da biomassa vegetal em muitos ecossistemas florestais, liberando carbono, nitrogênio e fósforo essenciais para a sustentação de redes alimentares complexas (12). Durante eventos de mudanças climáticas, como aumento das temperaturas globais, a atividade fúngica pode ser acelerada, levando a maior liberação de carbono armazenado no solo para a atmosfera, intensificando o efeito estufa (22). Por outro lado, sua capacidade de formar associações simbióticas com plantas pode ajudar a mitigar impactos, aumentando a eficiência de absorção de nutrientes pelas plantas em condições de estresse ambiental (27).

Taxonomia e nomenclatura dos fungos

A taxonomia e a nomenclatura dos fungos são campos dinâmicos, moldados por avanços científicos que vão desde observações morfológicas até análises moleculares de alta precisão. Historicamente, a classificação dos fungos baseou-se em características morfológicas e modos de reprodução, agrupando-os de acordo com estruturas como ascósporos, basidiósporos ou zigósporos. No entanto, essa abordagem frequentemente gerava classificações artificiais, já que características fenotípicas muitas vezes não refletiam a verdadeira história evolutiva dos grupos. Com o desenvolvimento da filogenética molecular, foi possível revisar essas classificações, estabelecendo um sistema que reflete mais acuradamente as relações evolutivas entre os fungos (30).

Uma proposta influente foi apresentada por Hibbett *et al.* (30), que introduziu uma classificação filogenética baseada em genes ribossomais. Este sistema consolidou sete filos principais: Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota e Mucoromycota. Os Ascomycota incluem fungos que produzem esporos em estruturas chamadas ascos, abrangendo desde leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* até fungos filamentosos como *Aspergillus*. Os Basidiomycota, conhecidos por produzir esporos sobre basídias, englobam fungos macroscópicos como

Agaricus bisporus e fungos medicinais como *Ganoderma lucidum*. Já os Glomeromycota compreendem fungos micorrízicos arbusculares, como *Rhizophagus irregularis*, que formam associações simbióticas com raízes de plantas, essenciais para a absorção de nutrientes. Chytridiomycota e Blastocladiomycota incluem fungos aquáticos ou de ambientes úmidos, muitos dos quais possuem esporos flagelados, como *Batrachomyces dendrobatidis*, um conhecido patógeno de anfíbios. Neocallimastigomycota são fungos anaeróbicos encontrados no trato digestivo de herbívoros, responsáveis pela digestão de celulose, enquanto os Mucoromycota incluem fungos de hifas asseptadas, como *Rhizopus stolonifer*, importantes na decomposição de matéria orgânica.

A proposta de Spatafora *et al.* (31) complementou essa classificação, refinando a posição dos antigos Zygomycota, que tradicionalmente eram considerados um único filo. A análise genômica revelou que esse grupo era polifilético, levando à sua divisão em dois fillos: Mucoromycota, que manteve o foco em fungos decompositores e simbiontes, e Zoopagomycota, que inclui principalmente fungos parasitas e predadores de outros microrganismos. Essa reclassificação destacou a necessidade de uma abordagem multifatorial, combinando morfologia, ecologia e genética para resolver complexidades taxonômicas.

Outra contribuição importante veio de Tedersoo *et al.* (32), que realizou uma análise global da diversidade fúngica usando sequências ITS (Espaciador Transcrito Interno, do inglês *Internal Transcribed Spacer*) como marcadores moleculares. Essa abordagem revelou lacunas significativas na amostragem de táxons, especialmente em regiões tropicais e em habitats especializados. O estudo também confirmou que os fillos Ascomycota e Basidiomycota juntos representam mais de 90% da diversidade fúngica conhecida, mas destacou a importância de outros grupos menos estudados, como Glomeromycota e Chytridiomycota, em ecossistemas específicos.

Lücking *et al.* (33) introduziram uma abordagem inovadora com a SBN (Nomenclatura Baseada em Sequenciamento, do inglês *Sequence-Based Nomenclature*), que visa associar nomes taxonômicos diretamente a sequências de DNA (Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*). Essa proposta responde a desafios práticos na identificação de fungos, especialmente em grupos criptogâmicos ou de difícil cultivo. Além disso, o uso de sequências como "códigos de barras" genéticos, particularmente a região ITS, facilita a padronização e amplia a acessibilidade para micologistas e ecologistas. Essa abordagem também é compatível com a regra "um fungo, um nome", implementada em 2013, que eliminou ambiguidades associadas à nomenclatura dualista entre anamorfos e teleomorfos.

Anteriormente a essas propostas, Cavalier-Smith (34), durante sua revisão dos grandes grupos de eucariotos em um sistema de seis reinos, sugeriu uma classificação ampla, introduzindo o conceito de "super-reino" Opisthokonta, que engloba fungos, animais e alguns protistas. Essa classificação baseia-se em características compartilhadas, como a presença de um flagelo posterior em células móveis e evidências moleculares que suportam uma origem comum. Dentro dos Opisthokonta, os fungos são agrupados no reino Fungi, enquanto os animais pertencem ao reino Animalia. Essa proposta destaca a proximidade evolutiva entre fungos e animais, sugerindo que ambos compartilham um ancestral comum mais recente entre si do que com plantas ou outros eucariotos.

Cavalier-Smith (34) propôs ainda o clado Dikarya, agrupando os filos Ascomycota e Basidiomycota sob esse clado, devido à presença de um estágio dicariótico prolongado em seu ciclo de vida, onde dois núcleos haploides coexistem na mesma célula sem fusão imediata. O reconhecimento do Dikarya como um clado monofilético foi posteriormente corroborado por estudos moleculares e filogenéticos que usaram marcadores genéticos conservados, como genes ribossomais e proteínas nucleares. Essa proposta foi integrada em classificações mais recentes, como as de Hibbett *et al.* (30) e Spatafora *et al.* (31), que reforçaram a robustez do clado Dikarya com base em evidências genômicas. A inclusão dos Dikarya dentro do reino Fungi destaca sua importância evolutiva e ecológica, dado que esses dois filos representam a maior parte da diversidade fúngica conhecida, com papéis cruciais na decomposição, simbiose e patogenicidade.

Morfologia e biologia dos fungos

Os fungos constituem um reino diverso com características morfológicas e fisiológicas únicas, fundamentais para sua classificação e compreensão. A morfologia fúngica varia entre formas vegetativas filamentosas e leveduriformes e estruturas reprodutivas especializadas associadas a fases assexuadas e sexuadas. Esses aspectos morfológicos desempenham papéis críticos na sobrevivência, absorção de nutrientes, dispersão e propagação, crescimento e interação com o meio ambiente e hospedeiros (29,35).

Esses organismos possuem estruturas vegetativas que constituem a base de sua organização biológica e funcional, sendo as hifas seus elementos mais representativos. As hifas são filamentos tubulares que, em conjunto, compõem o micélio, caracterizado por uma trama

ou rede filamentosa a partir da qual as estruturas reprodutivas se desenvolvem. Essas estruturas ampliam significativamente a superfície de absorção de nutrientes e são particularmente importantes para a colonização de múltiplos e variados substratos. A plasticidade morfológica das hifas é crucial para a sobrevivência fúngica em ambientes dinâmicos, conforme descrito por Gow e Gadd (36).

Em termos morfológicos, as hifas incluem dois tipos principais, baseados na presença ou ausência de septos, podendo ser, por isso, classificadas em septadas (apocíticas) e asseptadas (cenocíticas). Esses septos são projeções transversais da parede celular fúngica em direção à luz da estrutura filamentosa, segmentando ou delimitando de espaço em espaço compartimentos celulares distintos. Os septos, no entanto, apresentam um poro septal central que permite a passagem do material citoplasmático, nuclear e nutricional por todo o comprimento do micélio. Aquelas hifas que não apresentam septos, o conteúdo hifálico circula livremente dentro da estrutura. Efetivamente, essa morfologia asseptada permite um fluxo irrestrito de organelas e nutrientes ao longo do filamento, o que facilita o eficiente e rápido crescimento em ambientes ricos em matéria orgânica (37,38).

Além das septações, as hifas podem ser também divididas de acordo com a presença ou ausência de deposição de pigmentos melanoides na parede celular. Hifas sem melanina apresentam uma aparência translúcida e são denominadas de hialinas. Já as hifas com melanina exibem uma coloração escura e são denominadas de demáceas. Com relação à coloração, as hifas septadas podem ser hialinas ou demáceas enquanto as hifas asseptadas são sempre hialinas. Fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota são sempre de hifas septadas. Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* apresentam hifas septadas hialinas e aqueles dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium* e *Curvularia* exibem hifas septadas demáceas. Especificamente, as hifas asseptadas são encontradas em fungos do filo Mucoromycota, como o *Mucor*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum*. Importa mencionar ainda que a melanina das hifas demáceas tem sido amplamente estudada pela proteção que confere aos fungos contra a radiação UV e estresses oxidativos, bem como por seu papel na evasão fúngica do sistema imunológico do hospedeiro (39,40).

O outro grupo de fungos de importância são os leveduriformes. Esses organismos têm como estruturas vegetativas células de leveduras que apresentam um aspecto morfológico globoso, ovoide ou cilíndrico. Caracteristicamente, alguns fungos leveduriformes produzem estruturas chamadas de pseudohifas. As pseudohifas representam uma forma intermediária entre células de leveduras e hifas verdadeiras. Elas consistem em cadeias de células

leveduriformes alongadas conectadas, mas incompletamente separadas e com constrições detectáveis em suas junções (41,42).

As pseudohifas são características de fungos como *Candida albicans*, que alterna sua morfologia dinamicamente entre formas leveduriformes, pseudohifas e hifas verdadeiras em resposta a condições ambientais e sinais do hospedeiro. Essa plasticidade morfológica é regulada por fatores como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, sendo essencial para a patogenicidade de *Candida* spp. As pseudohifas são críticas para a invasão de tecidos hospedeiros, proporcionando maior mobilidade e adaptação quando comparadas com as células leveduriformes. Durante as infecções, *Candida albicans* utiliza essas estruturas para se adaptar a diferentes nichos do hospedeiro, evadindo respostas imunológicas e colonizando tecidos com maior eficiência (41,43).

Apesar de não ser considerado como um outro tipo morfológico, mas sim como uma característica biológica, dentro do grupo dos fungos, existem espécies capazes de modificar a sua morfologia em função das condições de cultivo, exibindo uma fase filamentosa (sapróbia) e leveduriforme ou de esférula (parasitária). Esses fungos são denominados de dimórficos, tendo em vista apresentarem uma morfologia filamentosa, quando se desenvolvem no meio ambiente como decompositores ou in vitro à temperatura de 25–30 °C, ou leveduriforme, quando produzem infecção ou crescem in vitro à temperatura de 35–37 °C. Como tipicamente dimórficos, podem ser mencionados o *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii*. Essas variações estruturais vegetativas (e reprodutivas) demonstram a complexidade adaptativa dos fungos, permitindo que eles prosperem em condições ambientais e imunológicas diversas. Essas adaptações estruturais não apenas garantem a sobrevivência, mas também tornam os fungos organismos mais eficientes na exploração de nichos ecológicos e na interação com hospedeiros (44,45).

Os fungos também possuem uma variedade de estruturas reprodutivas assexuadas e sexuadas. A reprodução assexuada é um mecanismo fundamental para a sobrevivência e dispersão dos fungos, permitindo uma rápida proliferação nos ambientes e a colonização de novos substratos. Este processo não envolve recombinação genética e ocorre por simples diferenciação do sistema vegetativo onde é empregada diferentes estratégias, que variam conforme o grupo taxonômico e as condições ambientais. Entre os mecanismos mais comuns estão a formação de esporos (conídios e esporangiósporos), fragmentação de hifas (artrósporos e clamidósporos) e brotamento (blastósporos). Cada um desses processos contribui para a adaptabilidade e sucesso evolutivo dos fungos em uma ampla gama de ecossistemas (35,46).

A formação de conídios é um dos principais modos de reprodução assexuada nos fungos filamentosos, especialmente nos filos Ascomycota e Basidiomycota. Os conídios são esporos assexuados exógenos produzidos sobre células especializadas chamadas células conidiogênicas, que geralmente se encontram no ápice de estruturas denominadas conidióforos, que emergem das hifas septadas como uma haste. Esses esporos podem ser unicelulares ou multicelulares, e sua liberação facilita a dispersão pelo vento, água ou vetores biológicos. Em fungos como *Aspergillus* spp. e *Curvularia* spp., os conídios desempenham papel essencial na proliferação em ambientes ricos em nutrientes, além de serem relevantes em contextos de patogenicidade, já que, por serem estruturas com aerodinâmica e ficarem em suspensão no ar (aerovagantes), podem entrar em contato com o parênquima pulmonar, quando inalados pelos hospedeiros (38,46,47).

Um tipo específico de conídio, os artrósporos, é formado pela fragmentação das hifas vegetativas em segmentos que atuam como propágulos. Esse mecanismo é particularmente importante em fungos patogênicos, como os dermatófitos (*Microsporum* spp., *Trichophyton* spp. e *Epidermophyton* sp.) e o *Coccidioides immitis*, onde os artrósporos representam a principal forma parasitária e infectante, respectivamente. Já os clamidósporos são estruturas especializadas de resistência, formadas por células vegetativas (hifas ou leveduras), que tornam suas paredes espessas e rígidas, permitindo a sobrevivência em condições ambientais adversas. Fungos como *Candida albicans* utilizam clamidósporos para persistir em períodos de estresse ambiental ou escassez de nutrientes (41,46).

Nos fungos do filo Mucoromycota, a reprodução assexuada ocorre por meio da formação de esporângios, que são sustentados por esporangióforos que, como os conidióforos, emergem como hastes das hifas asseptadas. Os esporângios contêm numerosos esporangiósporos, que são esporos endógenos liberados após a ruptura da parede do esporângio (membrana peridial). Essa estratégia é altamente eficiente em termos de produção e dispersão de esporos, sendo observada em gêneros como *Mucor* spp. e *Rhizopus* spp. Estudos mostram que essa forma de reprodução é adaptada para ambientes ricos em matéria orgânica, onde a rápida colonização é essencial para competir com outros microrganismos (47,48).

A reprodução assexuada também pode ocorrer por meio de brotamento ou gemulação, um processo comum em fungos leveduriformes, como *Candida* spp. Menos frequentes, contudo, mas também um mecanismo utilizado por leveduras, é a reprodução por cissiparidade ou divisão binária, tipicamente observada em *Saccharomyces* spp. No brotamento, uma célula-parental gera uma célula-filha menor, denominada de blastósporo (broto ou gêmula), que eventualmente se separa da célula original. Em alguns casos, como em *Candida albicans*, o

brotamento pode resultar na formação de pseudohifas (como mencionado anteriormente), quando as células-filhas permanecem conectadas às células-parentais e a outras células-filhas por constrições nos pontos de ligação. A cissiparidade, por sua vez, ocorre por alongamento dos polos da célula de levedura com formação de um septo central, separando a célula-parental da célula-filha, que têm o mesmo tamanho (41,42,49).

Os diferentes mecanismos de reprodução assexuada garantem aos fungos alta plasticidade e capacidade adaptativa. A rápida produção de esporos permite sua dispersão em ampla escala, enquanto estratégias de resistência, como clamidósporos, asseguram a sobrevivência em condições adversas ou extremas. A capacidade de alternar entre formas de reprodução assexuada e sexuada é outra característica que contribui para o sucesso ecológico dos fungos, conferindo-lhes resiliência frente a desafios ambientais e seletivos (35,38,46).

A reprodução sexuada é também outro processo essencial para muitos fungos, permitindo a recombinação genética e a geração de diversidade, fatores críticos para a adaptação e evolução nos diferentes ambientes e condições. Esse mecanismo envolve a união de citoplasmas de células ou estruturas especializadas (plasmogamia), a fusão de núcleos haploides (cariogamia) e a ocorrência de meiose, que resulta na formação de esporos sexuados. A complexidade e diversidade desse processo variam amplamente entre os principais filos de fungos (Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota), refletindo adaptações evolutivas específicas (35,39,50).

Nos fungos do filo Ascomycota, a reprodução sexuada é caracterizada pela formação de estruturas especializadas chamadas de ascos, de aspecto saculiforme, e que contêm esporos sexuados endógenos, denominados de ascósporos. O processo inicia-se com a plasmogamia entre hifas compatíveis, seguida pela formação de células dicarióticas, onde dois núcleos haploides coexistem sem fusão imediata. Posteriormente, ocorre a cariogamia, que forma um núcleo diploide temporário, seguido pela meiose e, em alguns casos, mitoses adicionais que resultam na produção de ascósporos dentro dos ascos. Esses ascos são eventualmente encontrados ainda dentro de outros em corpos de frutificação conhecidos como gimnotécio ou cleistotécio (globosos e fechados), peritécio (em forma de frasco) ou apotécios (em forma de taça) (39,51).

O filo Basidiomycota é outro grupo que apresenta reprodução sexuada distinta. Nesse caso, a plasmogamia ocorre entre células ou estruturas especializadas, resultando na formação de hifas dicarióticas. Essas hifas se desenvolvem em corpos de frutificação macro ou macroscópicos (cogumelos), e no ápice das hifas especializadas, denominadas de basídias, ocorre a cariogamia, seguida de meiose. Essa sequência culmina na produção de esporos

sexuados exógenos chamados de basidiósporos, que são liberados e dispersos pelo vento ou outros agentes ambientais (35,39,52).

No filo Mucoromycota, a reprodução sexuada é caracterizada pela formação de zigósporos, esporos sexuados resultantes da fusão de gametângios compatíveis. Esses gametângios, geralmente localizados na extremidade de hifas, se fundem para formar um zigósporo diploide resistente. Essa estrutura é frequentemente recoberta por uma parede espessa, tornando-o altamente adaptado a condições ambientais adversas. Quando as condições se tornam favoráveis, o zigósporo germina, dando origem a um esporangióforo que produz esporângios contendo esporos sexuados endógenos (47,53).

A reprodução sexuada também é observada em grupos menos conhecidos, como os Chytridiomycota, que produzem gametas móveis flagelados em seu ciclo de vida. Esses gametas se fundem em meio aquático, resultando na formação de um zigoto. No caso dos fungos leveduriformes, esses organismos também podem apresentar reprodução sexuada com formação de ascos e ascósporos ou basídias e basidiósporos (20,52).

Apesar dos fungos obterem variabilidade genética através da reprodução sexuada, um mecanismo específico não associado à reprodução, denominado de ciclo parassexuado, permite que esses organismos também obtenham algum grau de variabilidade. O ciclo parassexuado é um processo de recombinação genética que ocorre em algumas espécies de fungos ambientais, caracterizando-se pela ausência de um ciclo sexual típico com cariogamia e meiose. Esse mecanismo é exclusivo de certos fungos, como os do gênero *Aspergillus*, e desempenha um papel essencial na geração de variabilidade genética, especialmente em espécies que não apresentam reprodução sexuada ou cuja reprodução sexuada é rara. Descoberto por Pontecorvo *et al.* (51) em *Aspergillus nidulans*, o ciclo parassexuado é uma alternativa eficiente para promover diversidade genética em condições ambientais desafiadoras (51,54,55).

No ciclo parassexuado, o processo inicia-se com a fusão de hifas ou células haploides geneticamente distintas, resultando na formação de uma célula heterocariótica, onde núcleos geneticamente diferentes coexistem no mesmo citoplasma. Essa fusão de hifas, chamada de anastomose, é um evento semelhante à plasmogamia observada na reprodução sexuada, mas não é seguido por um processo ordenado de cariogamia e meiose. Em vez disso, os núcleos na célula heterocariótica podem ocasionalmente se fundir, formando núcleos diploides (49,54).

Uma característica única do ciclo parassexuado é a instabilidade dos núcleos diploides, que frequentemente passam por perda cromossômica mitótica, levando à formação de núcleos aneuploides. A aneuploidia, embora geralmente considerada desvantajosa em muitos organismos, nos fungos pode conferir vantagens adaptativas, como tolerância a estresses

ambientais ou resistência a antifúngicos. Esses núcleos aneuploides podem eventualmente retornar ao estado haploide através de uma série de divisões mitóticas irregulares, restaurando a ploidia original, mas com nova composição genética, gerada pela recombinação entre os cromossomos parentais (49,55).

O ciclo parassexuado tem implicações significativas para a biologia e ecologia dos fungos. Ele oferece uma alternativa eficiente para gerar variabilidade genética em populações de fungos que vivem em ambientes heterogêneos ou sob pressão seletiva intensa, como o uso de antifúngicos em infecções humanas ou a competição por recursos em ecossistemas naturais. Essa plasticidade genética é uma das razões pelas quais os fungos são bem-sucedidos em um amplo espectro de habitats (31,49).

Micologia forense

A micologia forense é uma área emergente das ciências forenses que se dedica à aplicação do estudo dos fungos em investigações criminais. Os fungos, organismos amplamente distribuídos no meio ambiente e com uma enorme diversidade de formas e funções, desempenham papéis centrais no processo de decomposição de matéria orgânica, incluindo corpos humanos, e oferecem informações valiosas em cenários de crime. Essa área de estudo busca explorar características biológicas e ecológicas dos fungos para ajudar a responder questões críticas, como a estimativa do IPM, a identificação de locais de crime e a análise de vestígios ambientais. Embora ainda esteja em desenvolvimento, a micologia forense já apresenta potencial para complementar disciplinas tradicionais como a entomologia e a botânica forenses, tornando-se uma ferramenta indispensável em contextos em que métodos convencionais enfrentam limitações (56).

Os fungos decompositores desempenham um papel crucial na análise forense de cadáveres. Durante o processo de decomposição, espécies como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* colonizam o corpo de maneira ordenada, seguindo padrões de sucessão ecológica que variam conforme o estágio da decomposição. Esses padrões, influenciados por fatores ambientais como temperatura, umidade e composição do substrato, permitem correlacionar a presença de determinadas espécies com o tempo decorrido desde a morte. Estudos demonstram, por exemplo, que *Rhizopus stolonifer* é frequentemente encontrado nos estágios iniciais da decomposição, enquanto espécies como *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum*

predominam em fases mais avançadas. Esses fungos, ao degradarem os tecidos, refletem as condições locais e temporais em que o corpo foi exposto, fornecendo informações críticas para a estimativa do IPM (56,57).

A estimativa do IPM é uma das principais contribuições da micologia forense para investigações criminais. A taxa de crescimento de fungos é relativamente constante sob condições ambientais controladas, permitindo que os investigadores utilizem essa característica como uma linha do tempo biológica. A análise do crescimento micelial em tecidos, por exemplo, pode complementar métodos tradicionais, como a entomologia forense, especialmente em ambientes onde insetos não estão presentes, como locais urbanos, frios ou fechados. Hawksworth (54) destacou que a medição precisa do crescimento de fungos em experimentos laboratoriais, ajustados para reproduzir condições ambientais específicas, pode resultar em estimativas mais confiáveis do tempo decorrido desde a morte até a descoberta do corpo. Além disso, o uso de marcadores moleculares, como o ITS, permite identificar espécies de fungos mesmo em amostras degradadas, aumentando a precisão das análises (58).

Os fungos também são valiosos como vestígios forenses em investigações criminais, uma vez que suas estruturas microscópicas, como esporos e fragmentos de hifas, são extremamente resistentes e facilmente transportadas. Esses vestígios podem ser encontrados em roupas, calçados, veículos ou superfícies, funcionando como evidências que conectam indivíduos ou objetos a locais específicos. Por exemplo, esporos de fungos micorrízicos, que estão associados a solos florestais ou agrícolas, podem indicar que uma pessoa esteve em um determinado habitat. Esses esporos, por sua especificidade ecológica, têm sido usados para corroborar ou refutar álibis de suspeitos em investigações complexas. Wiltshire e Hawksworth (56) relataram casos em que vestígios fúngicos encontrados em calçados ajudaram a vincular suspeitos a cenas de crime, demonstrando a utilidade dos fungos como indicadores ambientais.

Outro campo significativo dentro da micologia forense é a análise de mortes relacionadas à exposição a fungos tóxicos ou psicoativos. Espécies como *Amanita phalloides* produzem toxinas letais que podem causar envenenamento fatal, enquanto fungos como *Psilocybe* geram compostos psicoativos associados a mortes acidentais ou intencionais. Hawksworth (54) enfatizou a importância de identificar essas espécies em casos de intoxicação, uma vez que sua presença pode fornecer evidências cruciais sobre a causa da morte. A análise de fungos tóxicos em alimentos, bebidas ou medicamentos pode ajudar a reconstruir os eventos que levaram a um óbito, adicionando uma dimensão importante às investigações forenses.

Apesar de seu potencial, a micologia forense enfrenta desafios significativos. A identificação precisa de fungos requer técnicas avançadas e conhecimento especializado, dado

o alto nível de diversidade entre as espécies e sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Métodos tradicionais de identificação, como observação morfológica, são frequentemente insuficientes para discriminar espécies próximas, especialmente em amostras degradadas. Nesse sentido, o sequenciamento de DNA, utilizando marcadores como o ITS, tem se mostrado revolucionário, permitindo a identificação de fungos com precisão e agilidade. No entanto, o custo e a necessidade de infraestrutura especializada ainda limitam sua aplicação em muitos contextos forenses (57). Além disso, fatores ambientais, como temperatura e umidade, podem alterar a dinâmica da colonização fúngica, introduzindo variáveis que dificultam a padronização de modelos de decomposição.

Mesmo apresentando limitações, o futuro da micologia forense é promissor. Com os avanços nas tecnologias de NGS (Sequenciamento de Próxima Geração, do inglês *Next Generation Sequencing*) e a crescente integração interdisciplinar com áreas como entomologia, botânica e toxicologia forenses, a aplicação dos fungos em investigações criminais tende a se expandir. Estudos recentes combinando dados de sucessão fúngica com perfis químicos de decomposição, como compostos voláteis emitidos por cadáveres, têm demonstrado grande potencial para melhorar a precisão na estimativa do IPM. Além disso, o desenvolvimento de bancos de dados abrangentes e a padronização de metodologias são passos fundamentais para consolidar a micologia forense como uma ciência amplamente reconhecida e aplicada (SINGH, 2018).

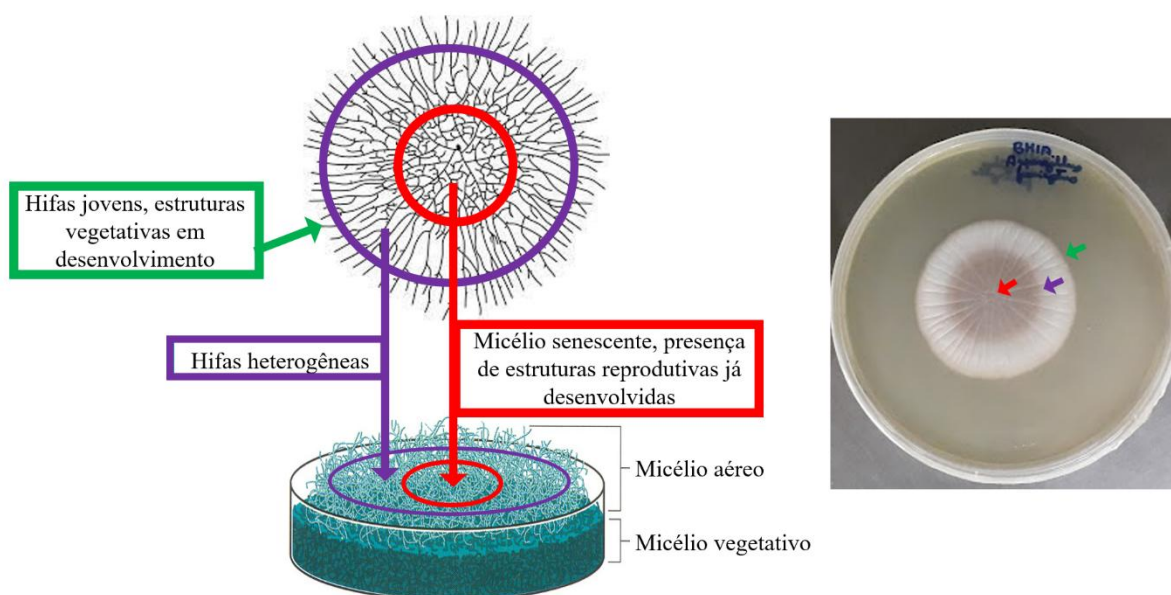
Laboratório e análise em micologia forense

O laboratório de micologia forense é um espaço especializado, dedicado à análise de fungos em um contexto investigativo e judicial, onde a ciência se encontra com a resolução de crimes. Nesse ambiente, elementos fúngicos desempenham papéis cruciais como indicadores de tempo, local ou circunstâncias de um evento investigado. A micologia forense utiliza os fungos não apenas como evidências passivas, mas como atores dinâmicos que interagem com o ambiente e os organismos envolvidos, proporcionando informações fundamentais para reconstruir cenários criminais.

Os fungos, devido à sua ubiquidade e diversidade, apresentam características biológicas que permitem sua utilização como ferramentas analíticas em diferentes contextos, já que são capazes de colonizar qualquer substrato, incluindo corpos humanos, solos, roupas e utensílios.

Eles desempenham papéis importantes no meio ambiente como sapróbios e exibem adaptações específicas que os tornam marcadores únicos em investigações criminais. Em casos de cadáveres encontrados em fase avançada de decomposição, por exemplo, certas espécies fúngicas aparecem colonizando de forma sequencial e previsível em estágios que variam de acordo com fatores condicionantes, como composição química do substrato, temperatura, pH e umidade. Esse padrão sucessional relacionado à ordem cronológica de desenvolvimento dos diferentes organismos fúngicos é um fenômeno bem documentado na ecologia forense e pode ser usado para estimar o IPM, fornecendo, dessa forma, informações temporais precisas sobre a morte de uma vítima (1) (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento característico das colônias fúngicas.



Legenda: Representação esquemática e foto de uma colônia fúngica e placa de Petri, destacando as diferentes regiões e características do micélio.

Fonte: Autoria própria

Como exemplo dessa sucessão fúngica, gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* são frequentemente encontrados nos estágios iniciais de decomposição, enquanto fungos como *Cladosporium* e *Alternaria* podem dominar em fases mais avançadas. Além disso, a presença de fungos termotolerantes ou xerófilos em cadáveres pode fornecer pistas sobre as condições ambientais em que o corpo foi mantido, contribuindo para a reconstituição do cenário do crime (2).

Além do papel temporal, elementos fúngicos presentes em ambientes específicos podem também ser analisados como vestígios para estabelecer conexões entre os envolvidos em um crime. Os fungos são bioindicadores geográficos e esporos de fungos encontrados em solos ou poeiras podem ser avaliados para determinar a origem geográfica de uma amostra. A composição micológica do solo é altamente específica de cada local, funcionando como uma assinatura ambiental única. Essa abordagem tem sido utilizada para relacionar suspeitos e vítimas a cenas de crime ou para rastrear movimentos de vítimas antes de sua morte (2).

A coleta de material micológico em uma cena de crime exige elevado rigor técnico e conceitual. O processo requer precisão e cuidado para evitar contaminações que comprometam a validade da evidência. Esta etapa envolve a coleta de amostras diretamente de substratos relevantes, como tecidos corporais, unhas, cabelos e fluidos corporais da vítima. Também são coletados materiais presentes no ambiente, como solos, poeiras e ar. A coleta de amostras de solo, por exemplo, requer técnicas que preservem as camadas estratigráficas, pois a profundidade de coleta pode influenciar a composição fúngica encontrada. No caso de esporos no ar, impactadores ou membranas filtrantes são utilizados para capturar partículas em suspensão, permitindo análises quantitativas e qualitativas detalhadas (4). Roupas, objetos pessoais e utensílios são igualmente examinados, pois os fungos podem aderir a superfícies por contato direto ou contaminação ambiental.

Após a coleta, as amostras devem ser transportadas ao laboratório sob condições controladas. Em geral, amostras biológicas são armazenadas em recipientes estéreis e mantidas a temperaturas que retardem o crescimento fúngico (4-8°C), preservando o estado original da evidência. A cadeia de custódia é outro aspecto fundamental para garantir a integridade e a rastreabilidade das evidências durante todas as etapas, incluindo transporte, armazenamento e análise laboratorial até sua apresentação no tribunal. O registro e a documentação meticulosa de cada etapa, incluindo a identificação dos responsáveis pelo manuseio da amostra biológica, é essencial para preservar a admissibilidade legal da evidência em processos judiciais (3,4).

Ao dar entrada no laboratório, as amostras passam por uma análise detalhada que combina métodos tradicionais e avançados. Inicialmente, faz-se o exame microscópico direto da amostra coletada, o que permite, eventualmente, a visualização de estruturas fúngicas vegetativas e/ou de reprodução. A análise morfológica é uma etapa fundamental na identificação de fungos em investigações forenses, oferecendo um diagnóstico inicial sobre a identidade taxonômica e o possível papel ecológico desses organismos. Com o auxílio de um microscópio óptico, lâmina e lamínula e corantes, como o KOH, o lactofenol de Aman e/ou o

azul de algodão, podem ser visualizadas hifas, corpos de frutificação e esporos de diferentes grupos fúngicos (4)

Uma análise preliminar da morfologia macroscópica pode ser feita ainda na cena do crime ao se avaliar as características morfológicas das colônias (cor, textura, margem, tamanho) antes da coleta da amostra ou já no laboratório de micologia forense, quando, por exemplo, roupas, sapatos, tapetes ou utensílios enviados pela polícia técnica contêm crescimento fúngico. Nessas condições, antes da avaliação microscópica das amostras, procede-se ao estudo macromorfológico.

Consecutivamente, as amostras micológicas são inoculadas em meios de cultura para isolamento e melhor caracterização. No campo da micologia forense, a cultura de fungos desempenha um papel central na análise laboratorial, fornecendo informações detalhadas sobre as propriedades biológicas, ecológicas e taxonômicas das espécies envolvidas em investigações criminais (1). Os fungos são organismos plásticos que respondem dinamicamente ao ambiente. Por isso, a cultura em laboratório não apenas permite o isolamento de colônias puras, mas também pode simular condições específicas, recriando temperaturas e microambientes em que os fungos se encontravam, refletindo o comportamento e a fisiologia desses microrganismos na cena do crime.

A temperatura é um fator crítico na cultura fúngica. Fungos patogênicos ou termotolerantes, como *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, crescem bem a 37°C, o que é relevante em casos envolvendo infecções humanas ou corpos expostos a ambientes em que esses fungos são endêmicos. Por outro lado, fungos sapróbios, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, encontrados em solos ou tecidos em decomposição, geralmente apresentam crescimento ótimo a 25°C. Essa distinção térmica pode fornecer pistas sobre a origem e o papel do fungo em contextos forenses (1).

Diferentes meios de cultura podem ser empregados em micologia forense. De maneira geral, os meios de cultura utilizados para o isolamento fúngico de cenas de crime são os mesmos usados na rotina dos laboratórios de micologia médica. Dentre esses, o SDA (Ágar Sabouraud Dextrosado, do inglês *Sabouraud Dextrose Agar*) e o PDA (Ágar Batata Dextrosado, do inglês *Potato Dextrose Agar*) são os mais difundidos. O exame macroscópico da cultura *in vitro* revela informações sobre o padrão de crescimento dos fungos, que pode ser interpretado ecologicamente. A taxa de crescimento e o desenvolvimento radial da colônia dependem da composição do meio de cultura e das condições de incubação, contribuindo também para a caracterização das espécies. O tempo necessário para o crescimento pode ser, inclusive, um indicador do IPM (1).

A caracterização posterior dos isolados utiliza dados morfológicos culturais, bioquímicos e/ ou genéticos para construir um perfil robusto que contextualiza a relação do fungo com o caso investigado. Após o exame macroscópico, as culturas são submetidas à análise microscópica, onde as estruturas vegetativas e, principalmente, reprodutivas dos fungos são avaliadas taxonomicamente. Essa etapa é sensível para a identificação dos fungos, pois estima-se que no ecossistema da Terra existam cerca de 13 milhões de espécies fúngicas, o que torna a avaliação da micromorfologia dos isolados uma tarefa complexa. Nesse sentido, a formação do perito é um ponto crítico para a avaliação morfológica, pois a multiplicidade de estruturas de reprodução tanto sexuada quanto assexuada, bem como de estruturas vegetativas e de suporte, exige um grande repertório de conhecimentos micológicos (4).

Embora o estudo morfológico seja a principal ferramenta para a identificação dos isolados fúngicos, técnicas complementares têm sido empregadas de forma cada vez mais frequente. O uso de provas moleculares tem sido introduzido em micologia forense para identificar inequivocamente espécies cuja identificação se mostra inconclusiva ou mesmo para análises de epidemiologia molecular. O sequenciamento de regiões conservadas, como ITS, LSU (Subunidade Grande, do inglês *Large subunit*) e SSU (Pequena subunidade, do inglês *Small subunit*), é considerado o padrão-ouro para a identificação de fungos. Essas regiões genômicas são suficientemente variáveis entre as espécies para permitir discriminação precisa, mesmo em amostras deterioradas ou com baixo número de esporos (4). Além disso, a espectrometria de massa MALDI-TOF (Laser de Dessorção Assistida por Matriz Ionização-Tempo de Voo, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) tem sido aplicada para identificar fungos com base em seus perfis proteicos únicos, oferecendo rapidez e confiabilidade na identificação, principalmente de fungos leveduriformes. Por fim, a MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) também tem sido usada para estudar estruturas fúngicas em alta resolução, permitindo caracterizar detalhes ultraestruturais que não são visíveis por métodos convencionais. Essa técnica é particularmente útil na análise de fungos associados a materiais sintéticos, como plásticos e tecidos, onde os padrões de colonização podem fornecer pistas sobre o tempo de exposição ou o ambiente de origem (4).

REVISÃO DA LITERTURA

A micologia forense é uma subdisciplina emergente das ciências forenses, aderida à microbiologia forense, que se dedica ao estudo de fungos em investigações criminais. A identificação, análise e interpretação de fungos encontrados em cenas de crime, corpos e diversos materiais forenses fazem parte disso. Esta área de estudo pode oferecer *insights* valiosos para auxiliar nas decisões judiciais, especialmente quando outras formas de prova biológica são limitadas ou ausentes (59).

Os fungos, por suas características biológicas únicas, desempenham um papel importante na decomposição de matéria orgânica. A capacidade de produzir esporos que se dispersam facilmente pelo ar permitem que eles colonizem uma ampla variedade de ambientes, incluindo aqueles que podem estar inacessíveis a outros organismos, como artrópodes, assim, impedindo a aplicação da entomologia forense como ferramenta (56,60). Como resultado, podem ser valiosas para auxiliar na determinação do tempo de post-mortem e na reconstrução de cenários de crime. Por exemplo, diferentes espécies de fungos colonizam corpos em distintos estágios de decomposição, fornecendo assim informações importantes que podem ser cruciais para determinar o IPM (61–63).

Os fungos podem contribuir também para outros ramos de investigação forense, incluindo casos de envenenamento por substâncias psicoativas e toxinas, fornecer evidências residuais que podem ser utilizados para ligar suspeitos a cenas de crime, localizar corpos em cemitérios clandestinos, isto é, funcionando como sinalizadores, e indicar o tempo de deposição, por exemplo, a análise de fungos em solos pode contribuir para determinar se um corpo foi movido ou se um objeto foi transportado de um lugar para outro (60).

Apesar de suas promissoras aplicações, a micologia forense enfrenta uma série de desafios que têm dificultado sua integração ampla e consistente nas investigações criminais. Um dos principais problemas é o desconhecimento entre os investigadores de cena de crime e agentes de investigação sobre o significativo potencial dos fungos. Em diversas situações em que essa abordagem foi utilizada como evidência, a capacidade dos agentes de identificar a presença de fungos teve um impacto positivo no andamento da investigação (56,64). Ainda há uma lacuna significativa no treinamento e na disseminação de conhecimento especializado entre os profissionais da área, e a falta de padronização nos métodos de coleta, armazenamento e análise de amostras fúngicas que também pode se apresentar como um respectivo problema. Essa variabilidade pode resultar em inconsistências nos resultados, dificultando a validação e a replicação dos estudos (65).

A identificação precisa de espécies fúngicas também representa um desafio significativo. Embora os avanços em técnicas de microbiologia e genética tenham melhorado

a capacidade de identificar fungos com maior precisão, essas técnicas nem sempre estão disponíveis ou são economicamente viáveis para todos os laboratórios forenses (66). Além disso, essas técnicas precisam ser realizadas por profissionais especialistas em micologia, uma vez que a interpretação dos dados pode ser complexa devido à grande diversidade de espécies de fungos e à sua sensibilidade a variações ambientais. Fatores como temperatura, umidade e a presença de outros microrganismos podem influenciar a composição das comunidades fúngicas, complicando a análise e a interpretação das evidências (56,61,67).

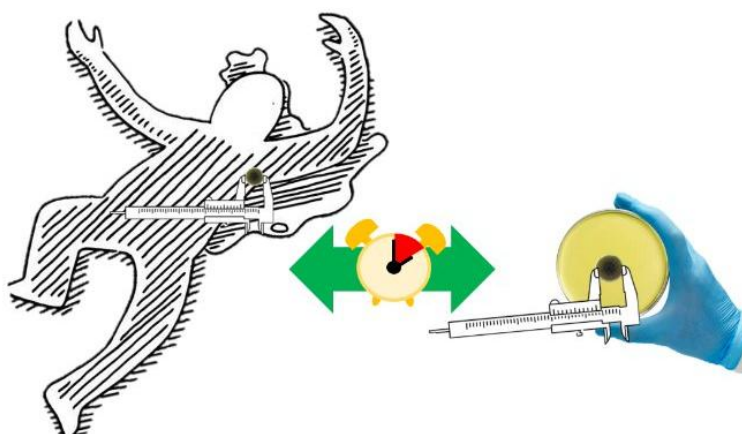
Neste contexto, esta revisão sistemática busca fornecer uma avaliação objetiva de como a micologia pode auxiliar a investigação criminal por meio da pergunta-chave: “Em cadáveres humanos, como o uso de fungos pode auxiliar a prática da ciência forense por meio da análise das aplicações micológicas utilizadas no âmbito criminal como uma ferramenta útil para resolução de casos judiciais?”.

Nesse sentido, a busca por outros métodos biológicos que possam ser empregados como alternativa ou adjuvante para a determinação do IPM é fundamental para um trabalho assertivo da perícia criminal. Assim, num contexto de busca por novas ferramentas, aparecem, como possibilidade de uso, os organismos fúngicos (64,65,68). Como no processo de degradação, insetos e fungos iniciam a decomposição da matéria orgânica de forma conjunta, estando, por isso, ambos os grupos presentes no material cadavérico, o crescimento fúngico sobre a superfície dos corpos pode ser também utilizado como ferramenta para estimar o IPM. Além disso, por apresentarem dimensões microscópicas e possuírem esporos aerovagantes, os fungos têm acesso a ambientes cujos artrópodes, em decorrência de suas próprias características biológicas, podem não ter. Dessa forma, a micologia forense, com todo o seu potencial metodológico, surge em perspectiva (59,69,70).

O uso de evidências fúngicas em investigações criminais é considerado relativamente recente e ainda apresenta pequena quantidade de dados publicados na literatura, pois há poucos profissionais da esfera judicial que possuem conhecimentos na área da micologia forense. Inicialmente, o envolvimento dos fungos em investigações criminais era restrito a casos de intoxicações por espécies venenosas e psicotrópicas, no entanto, com a evolução e difusão da própria micologia como ciência, foram sendo incorporados e aprimorados os métodos de estudo de vestígios e estimativa do tempo de morte, através do emprego desses organismos, ganhando a micologia forense, por isso, maior interesse, até mesmo por conta dos resultados preliminares satisfatórios e promissores que têm sido observados com essa nova ferramenta (60,64,65,71).

Na literatura, tem sido, de forma eventual, reportado que colônias fúngicas em cadáveres humanos ou associadas a eles podem fornecer indicações sobre a hora da morte, quando são avaliados e isolados em cultura de laboratório. Para tanto, compara-se o diâmetro de uma colônia fúngica eventualmente encontrada no local da perícia com aquele obtido do isolado *in vitro*, anotando-se o tempo decorrido para que ambas as colônias tenham a mesma dimensão e mimetizadas no laboratório as condições de temperatura e umidade aferidas no corpo e local do crime, as colônias fúngicas recuperadas podem fornecer indicações mais precisas sobre o período *post-mortem* (Figura 2).

Figura 2: Estimativa do intervalo *post-mortem*.



Legenda: Paquímetro para medir colônias fúngicas em estudos forenses. Compara-se o diâmetro de uma colônia do local do crime com uma cultivada em laboratório sob condições similares, como temperatura e umidade, para estimar com precisão o período *post-mortem*.

Fonte: Autoria própria

No entanto, para a confiabilidade da estimativa do IPM, as culturas devem ser procedidas em condições adequadas e que simulem o mais fidedignamente aquelas prevalentes no ambiente onde o corpo foi encontrado. Nesse sentido, informações básicas como a forma e as circunstâncias de como o corpo foi depositado ou armazenado na cena do crime, a temperatura e a umidade corporal e local, as vias e elementos de contaminação fúngica externa ou ambiental, o tamanho e a localização das colônias fúngicas no corpo e no entorno, incluindo solo, mobiliário, fômites e utensílios e vestuários, são fundamentais em micologia legal. Contudo, importa mencionar que, apesar da coleta de dados em cenas de crimes, há, de fato, pouca informação sobre as características fúngicas e as taxas de crescimento de suas colônias em tecidos humanos mortos (72–74). Além disso, a omissão da literatura agrava ainda mais o desconhecimento sobre a biologia dos fungos em ambiente forense.

Como não se tem informações consistentes sobre se os fatores ambientais podem acelerar ou retardar, e o quanto, o processo de deterioração da matéria orgânica, interferindo nas características e na velocidade de crescimento fúngico, prejudicando a estimativa do IPM, abre-se, por conseguinte, um vasto campo de pesquisa acadêmica. Pontualmente, nesse contexto de desconhecimentos, não se tem avaliados os efeitos dos meios de cultura tradicionais, utilizados para o isolamento em laboratório dos fungos encontrados sobre cadáveres, principalmente sobre a velocidade de crescimento desses organismos. Uma vez que os meios micológicos de rotina são constituídos por extratos vegetais, que estimulam a rápida esporulação fúngica, os isolados nesses substratos podem não apresentar a mesma velocidade de crescimento da cena do crime, o que pode levar a análises e conclusões equivocadas ou distorcidas acerca do tempo decorrido.

Pelo exposto, o presente trabalho pretende produzir e avaliar meios de cultura a base de extrato animal constituído por peças de açougue análogas ao órgão do cadáver de onde o fungo foi isolado, a fim de fornecer ao microrganismo o mesmo substrato, além das condições de temperatura e umidade semelhantes às da cena do crime, para que se diminua, ao máximo, os interferentes ambientais sobre as características biológicas de fungos empregados como evidência. Como outro objetivo da pesquisa em tela, tenciona-se elaborar uma revisão sistemática sobre o papel da micologia forense no âmbito criminal a fim de analisar a importância dessa ferramenta na área criminalística.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Sistematizar as evidências científicas relacionadas ao uso dos fungos no âmbito criminal e elaborar um protocolo de confecção de meios de cultura para o isolamento de fungos encontrados como evidência em cenas de crime.

1.2. Objetivos específicos

- a) Realizar uma revisão sistemática da literatura científica referente a utilidade da micologia no âmbito criminal;
- b) Desenvolver protocolos padronizados para a confecção de meios de cultura com base animal, empregando peças de açougue como constituintes;
- c) Avaliar e comparar as taxas de crescimento fúngico dos novos meios a base de extrato animal com os meios tradicionalmente empregados na rotina do laboratório de micologia médica e forense.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Pergunta chave

“Em cadáveres humanos, como o uso de fungos pode auxiliar a prática da ciência forense por meio da análise das aplicações micológicas utilizadas no âmbito criminal como uma ferramenta útil para resolução de casos judiciais?”

2.2. Estratégia de busca

A metodologia desenvolvida está de acordo com o protocolo para revisões sistemáticas proposto pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Metanalysis* (PRISMA) e incluiu as etapas: formulação da estratégia de busca na literatura, seleção de artigos utilizando critérios de inclusão e exclusão, avaliação da qualidade metodológica e risco de vieses dos estudos selecionados, seguido da extração e tabulação de dados (75).

A busca da literatura foi realizada de maneira independente por três pesquisadores, que estabeleceram previamente os critérios de busca, de maneira a selecionar artigos publicados até fevereiro de 2024, nos idiomas inglês, espanhol e português.

Inicialmente foi realizada a estratégia PICO (76) da seguinte maneira:

P (População): Cadáveres humanos ou amostras de corpos humanos após a morte.

I (intervenção): Análise dos fungos presentes em cadáveres ou cenas de crime.

C (Comparação): As aplicações micológicas utilizadas no âmbito criminal.

O (Outcome/desfecho): Determinar que o uso dos fungos pode auxiliar na decisão de casos judiciais.

Utilizando a estratégia PICO foram definidos os temas que foram combinados pelo operador booleano “AND”. Cada tema foi criado pela utilização do operador “OR” e foram pesquisados em palavras do título, resumo e palavras-chaves na indexação “MeSH terms”.

O primeiro tema foi criado para incluir as diferentes formas de mencionar a população (P) de interesse da pergunta central da revisão, e incluíram as seguintes palavras-chaves:

“cadaver” OR “body remains”; o segundo para representar a intervenção (I), ou seja, o método de análise, incluindo “mitosporic fungi” OR “fungi” OR “yeasts” OR “fungi unclassified”; o terceiro tema para representar as diferentes aplicações de uso, comparação (C): “forensic microbiology” OR “ forensic science” OR forensic toxicology” OR “ forensic genetics” OR “post-mortem changes” OR “bioreerrorism”. E o quarto tema, as finalidades (O), incluindo: “decision making shared” or “forensic medicine” or “jurisprudence” or “evidence gaps”.

Após o registro do protocolo no Prospero (CRD 42024506547), essas sintaxes foram utilizadas para efetuar a busca por artigos originais nas bases de dados: PUBMED, EMBASE, Web of Science, LILACS e OpenGrey, tendo sido adaptada para cada uma das bases (Tabela 1).

Tabela 1 - Sintaxe utilizada em cada uma das bases eletrônicas para realização das buscas por artigos.

Medline	–(((Cadaver[MeSH] OR cadaver [tiab] OR corpse [tiab]) OR (Corpse dismemberment[MeSH] OR Corpse dismemberment [tiab] OR
PUBMED	cadaver dismemberment [tiab]) OR (Body Remains [MeSH] OR Body Remains [tiab] OR human remains [tiab] OR Skeletal Remains [tiab])) AND ((Mitosporic Fungi [MeSH] OR Deuteromyc* [tiab] OR Fungi imperfecti [tiab] OR Fungi Mitosporic [tiab] OR Hyphomycetes [tiab]) OR (Fungi [MeSH] OR fungi [tiab] OR Molds [tiab]) OR (Yeasts [MeSH] OR yeast* [tiab]) OR (Fungi Unclassified [MeSH] OR Fungi incertae sedis [tiab])) AND ((Forensic Microbiology [tiab] OR Microbial Forensic Science [tiab] OR Microbial Forensics [tiab] OR Postmortem Microbiology [tiab]) (Mycology [MeSH] OR Mycology [tiab]) OR (Forensic Sciences [MeSH] OR Forensic Sciences [tiab]) OR (Forensic Toxicology [MeSH] OR Forensic Toxicology [tiab]) OR (Forensic Genetics [MeSH] OR Forensic Genetics [tiab]) OR (Phytopathology [tiab] OR Plant Mycology [tiab]) OR (Aflatoxin Poisoning [MeSH] OR Aflatoxin Poisoning [tiab] OR Aflatoxicosis [tiab] OR Aflatoxin Toxicity [tiab]) OR (Mycotoxycosis [MeSH] OR Mycotoxycosis [tiab] OR Poisoning Fungus [tiab]) OR (Microbiological Techniques [MeSH] OR Microbiologic* Techni* [tiab]) OR (Mushroom Poisoning [MeSH] OR Mushroom Poisoning [tiab]) OR (Postmortem Changes [MeSH] OR Postmortem Changes [tiab]) OR (Autopsy [MeSH] OR Autops* [tiab] OR Post-Mortem Examination [tiab] OR Post-Mortem Examination [tiab]) OR (Biological Warfare Agents [MeSH] OR Biological Warfare Agents [tiab] OR Biological Select Agents [tiab] OR Biological Weapons [tiab] OR Bioterrorism Agents [tiab] OR Biowarfare Agents [tiab]) OR (Bioterrorism [MeSH] OR Bioterrorism [tiab] OR Biocrime [tiab] OR Biological Terrorism [tiab])) AND ((Decision Making Shared [MeSH] OR Decision Making Shared [tiab]) OR (Decision Making [MeSH] OR Decision Making [tiab]) OR (Legal Case* [tiab] OR Legal Brief [tiab]) OR (Forensic Medicine [MeSH] OR Forensic Medicine [tiab] OR Legal Medicine [tiab] OR Medicine Forensic [tiab] OR Medicine Legal [tiab]) OR (Jurisprudence [MeSH] OR Jurisprudence [tiab] OR Medical Jurisprudence [tiab] OR State Interest [tiab]) OR (Decision Support Techniques [MeSH] OR Decision Support Techniques [tiab] OR Analysis Decision [tiab] OR Decision Aids [tiab] OR Decision Analysis [tiab] OR Decision Modeling [tiab]) OR (Evidence

Gaps [MeSH] OR Evidence Gaps [tiab] OR Evidence Practice Gaps [tiab] OR Insufficient Evidence [tiab] OR Research Gaps [tiab])
 OR (War Crimes [MeSH] OR crime war [tiab] OR war crime [tiab]) OR (Crime [MeSH] OR crim* [tiab] OR kidnapping* [tiab]))

EMBASE ('cadaver'/exp OR 'cadaver' OR 'corpse' OR 'corpse dismemberment'/exp OR 'corpse dismemberment' OR 'cadaver dismemberment'
 OR 'body remains'/exp OR 'body remains' OR 'human remains' OR 'skeletal remains') AND ('deuteromycetes'/exp OR
 'deuteromycetes' OR 'mitosporic fungi' OR 'fungi imperfecti' OR 'hyphomycetes'/exp OR 'hyphomycetes' OR 'arthrodermataceae'/exp
 OR 'arthrodermataceae' OR 'arthroderma'/exp OR 'arthroderma' OR 'ctenomyces'/exp OR 'ctenomyces' OR 'dermatophyte'/exp OR
 'dermatophyte' OR 'dermatophytes' OR 'airborne fungus'/exp OR 'airbone fungus' OR 'lower plant'/exp OR 'lower plant' OR 'fungal
 allergy'/exp OR 'fungal allergy' OR 'keratinomyces'/exp OR 'keratinomyces' OR 'nannizzia'/exp OR 'nannizzia' OR 'fungus'/exp
 OR 'fungus' OR 'fungi' OR 'fungi unclassified' OR 'medicinal mold'/exp OR 'medicinal mold' OR 'molds' OR 'yeast'/exp OR 'yeast'
 OR 'yeasts' OR 'mycology'/exp OR 'mycology' OR 'dermatomycosis'/exp OR 'dermatomycoses' OR 'mycosis'/exp OR 'mycosis' OR
 'mycoses' OR 'fungus diseases') AND ('forensic microbiology'/exp OR 'forensic microbiology' OR 'microbial forensic science' OR
 'microbial forensics' OR 'postmortem microbiology'/exp OR 'postmortem microbiology' OR 'microbiological examination'/exp
 OR 'microbiological examination' OR 'mycological typing techniques' OR 'fungal typing techniques' OR
 'microbiological techniques' OR 'forensic sciences'/exp OR 'forensic sciences' OR 'forensic pathology'/exp OR 'forensic
 toxicology'/exp OR 'forensic toxicology' OR 'forensic genetics'/exp OR 'forensic genetics' OR 'forensic botany'/exp OR 'forensic
 botany' OR 'forensic phytopathology' OR 'aflotoxicosis' OR 'aflatoxin poisoning' OR 'microbiology'/exp OR 'microbiology' OR
 'air microbiology' OR 'water microbiology' OR 'environmental microbiology'/exp OR 'environmental microbiology' OR
 'microbiology, environmental' OR 'mycotoxicosis'/exp OR 'mycotoxicosis' OR 'mushroom poisoning'/exp OR 'mushroom
 poisoning' OR 'poisoning fungus' OR 'food control'/exp OR 'food control' OR 'food microbiology' OR 'microbiological phenomena
 and functions'/exp OR 'microbiological phenomena and functions' OR 'microbiological phenomena' OR 'microbiological
 process' OR 'microbiological processes' OR 'phenomena microbiologic' OR 'postmortem change'/exp OR 'postmortem change' OR

'postmortem changes'/exp OR 'adipocere'/exp OR 'adipocere' OR 'livor mortis'/exp OR 'livor mortis' OR 'rigor mortis'/exp OR 'rigor mortis' OR 'algor mortis' OR 'autopsy'/exp OR 'autopsy' OR 'post-mortem examination' OR 'biological warfare agent'/exp OR 'biological warfare agent' OR 'biological warfare agents' OR 'bioterrorism'/exp OR 'bioterrorism' OR 'biological terrorism') AND ('shared decision making'/exp OR 'shared decision making' OR 'decision making shared' OR 'decision making'/exp OR 'decision making' OR 'forensic medicine'/exp OR 'forensic medicine' OR 'legal medicine' OR 'medicine legal' OR 'jurisprudence'/exp OR 'jurisprudence' OR 'decision support system'/exp OR 'decision support system' OR 'decision support techniques' OR 'multicriteria decision analysis'/exp OR 'multicriteria decision analysis' OR 'decision analysis' OR 'evidence gap'/exp OR 'evidence gap' OR 'evidence gaps' OR 'insufficient evidence' OR 'war crime'/exp OR 'war crime' OR 'war crimes' OR 'crime'/exp OR 'crime' OR 'kidnapping'/exp OR 'kidnapping')

Web of Science of(((ALL=(cadaver OR corpse OR “corpse dismemberment” OR “cadaver dismemberment” OR “Body Remains” OR “human remains” OR “Skeletal Remains”))) AND ALL=(“Mitosporic Fungi” OR Deuteromycetes OR deutoromycota OR “Fungi imperfecti” OR “Fungi Mitosporic” OR Hyphomycetes OR Fungi OR Molds OR Yeasts OR yeast OR “Fungi Unclassified” OR “Fungi incertae sedis”))) AND ALL=(“Forensic Microbiology” OR “Microbial Forensic Science” OR “Microbial Forensics” OR “Postmortem Microbiology” OR Mycology OR “Forensic Sciences” OR “Forensic Toxicology” OR “Forensic Genetics” OR Phytopathology OR “Plant Mycology” OR “Aflatoxin Poisoning” OR Aflatoxicosis OR “Aflatoxin Toxicity” OR Microbiology OR Mycotoxicosis OR “Poisoning Fungus” OR “Microbiologic* Techni*” OR “Mushroom Poisoning” OR “Postmortem Changes” OR Autops* OR “Post-Mortem Examination” OR “Biological Warfare Agents” OR “Biological Select Agents” OR “Biological Weapons” OR “Bioterrorism Agents” OR “Biowarfare Agents” OR Bioterrorism OR Biocrime OR “Biological Terrorism”)) AND ALL=(“Decision Making Shared” OR “Decision Making” OR “Legal Case*” OR “Legal Brief” OR “Forensic Medicine” OR “Legal Medicine” OR “Medicine Forensic” OR “Medicine Legal” OR Jurisprudence OR “Legal Aspects” OR “Legal Obligations” OR “Legal Status” OR “Medical Jurisprudence” OR “State Interest” OR “Decision Support Techniques” OR “Decision Analysis” OR “Decision Modeling” OR

“Evidence Gaps” OR “Evidence Practice Gaps” OR “Insufficient Evidence” OR “Research Gaps” OR “crime war” OR Crime OR Poaching OR kidnapping)

LILACS (“cadaver” OR “corpse” OR “corpse dismemberment” OR “cadaver dismemberment” OR “body remains” OR “human remains” OR **via portal** “skeletal remains”) AND (“fungi” OR “deuteromycetes” OR “deuteromycota” OR “fungi imperfecti” OR “fungi mitosporic” OR **regional da** “hyphomycetes” OR “molds” OR “yeasts”) AND (“forensic” OR “microbiology” OR “mycology” OR “pathology” OR **BVS** “phytopathology” OR “mycotoxicosis” OR “mushroom poisoning” OR “post-mortem” OR “autopsy” OR “bioterrorism”) AND (“decision making shared” OR “decision making” OR “legal case*” OR “legal brief” OR “forensic medicine” OR “legal medicine” OR “medicine forensic” OR “medicine legal” OR jurisprudence OR “legal aspects” OR “legal obligations” OR “legal status” OR “medical jurisprudence” OR “state interest” OR “decision support techniques” OR “decision analysis” OR “decision modeling” OR “evidence gaps” OR “evidence practice gaps” OR “insufficient evidence” OR “research gaps” OR “crime war” OR crime OR kidnapping) AND (db:("LILACS"))

(cadaver OR corpse OR “corpse dismemberment” OR “cadaver dismemberment” OR “body remains” OR “human remains” OR “skeletal remains”) AND (fungi OR deuteromycetes OR deuteromycota OR “fungi imperfecti” OR “fungi mitosporic” OR hyphomycetes OR molds OR yeasts) AND (forensic OR microbiology OR mycology OR pathology OR phytopathology OR **OpenGrey** mycotoxicosis OR “mushroom poisoning” OR post-mortem OR autopsy OR bioterrorism) AND (“decision making shared” OR **via DANS** “decision making” OR “legal case” OR “legal brief” OR “forensic medicine” OR “legal medicine” OR “medicine forensic” OR “medicine legal” OR jurisprudence OR “legal aspects” OR “legal obligations” OR “legal status” OR “medical jurisprudence” OR “state interest” OR “decision support techniques” OR “decision analysis” OR “decision modeling” OR “evidence gaps” OR “evidence practice gaps” OR “insufficient evidence” OR “research gaps” OR “crime war” OR crime OR kidnapping)

2.3. Critérios de inclusão

No critério de elegibilidade, foram incluídos os estudos completos em inglês, português e espanhol que utilizaram fungos crescendo em cadáveres humanos como ferramenta para resolução de casos judiciais.

2.4. Critérios de exclusão

Foram excluídos os artigos que correspondiam a revisões da literatura, revisões narrativas, revisões sistemáticas, meta-análises, resumos de congresso, editorial, estudos com outras técnicas não microbiológicas, resumo de simpósios, consenso, diretrizes.

2.5. Seleção de artigos

A seleção dos artigos foi feita de forma progressiva, iniciando pela leitura do título, depois do resumo e, por fim, pela leitura do artigo completo. A avaliação de elegibilidade de cada artigo foi feita de forma independente pelos três autores e as divergências foram resolvidas por consenso, excluindo todos aqueles que não atendiam aos critérios de inclusão estabelecidos. Foram considerados os seguintes parâmetros: autor, título, ano do artigo, tipo de participantes, objetivo principal do estudo, grupo fúngico avaliado, método de análise micológica e principais achados.

2.6. Estratégia para análise de dados

Esta revisão sistemática acompanhará todas as etapas do PRISMA. Para a análise de dados foi utilizado o gerenciador Rayyan QCRI, um aplicativo da web que auxilia em pesquisas do tipo revisão sistemática e metanálise, e os dados extraídos de cada estudo foi organizado em uma tabela, incluindo título, autores e ano de publicação. A síntese dos dados será realizada de forma qualitativa e a extração dos dados ocorrerá a fim de analisar com maior precisão as informações e resultados dos artigos analisados. Por meio da análise destes resultados será avaliado o real potencial da micologia forense no âmbito criminal. Nenhuma análise estatística será realizada durante esta revisão sistemática.

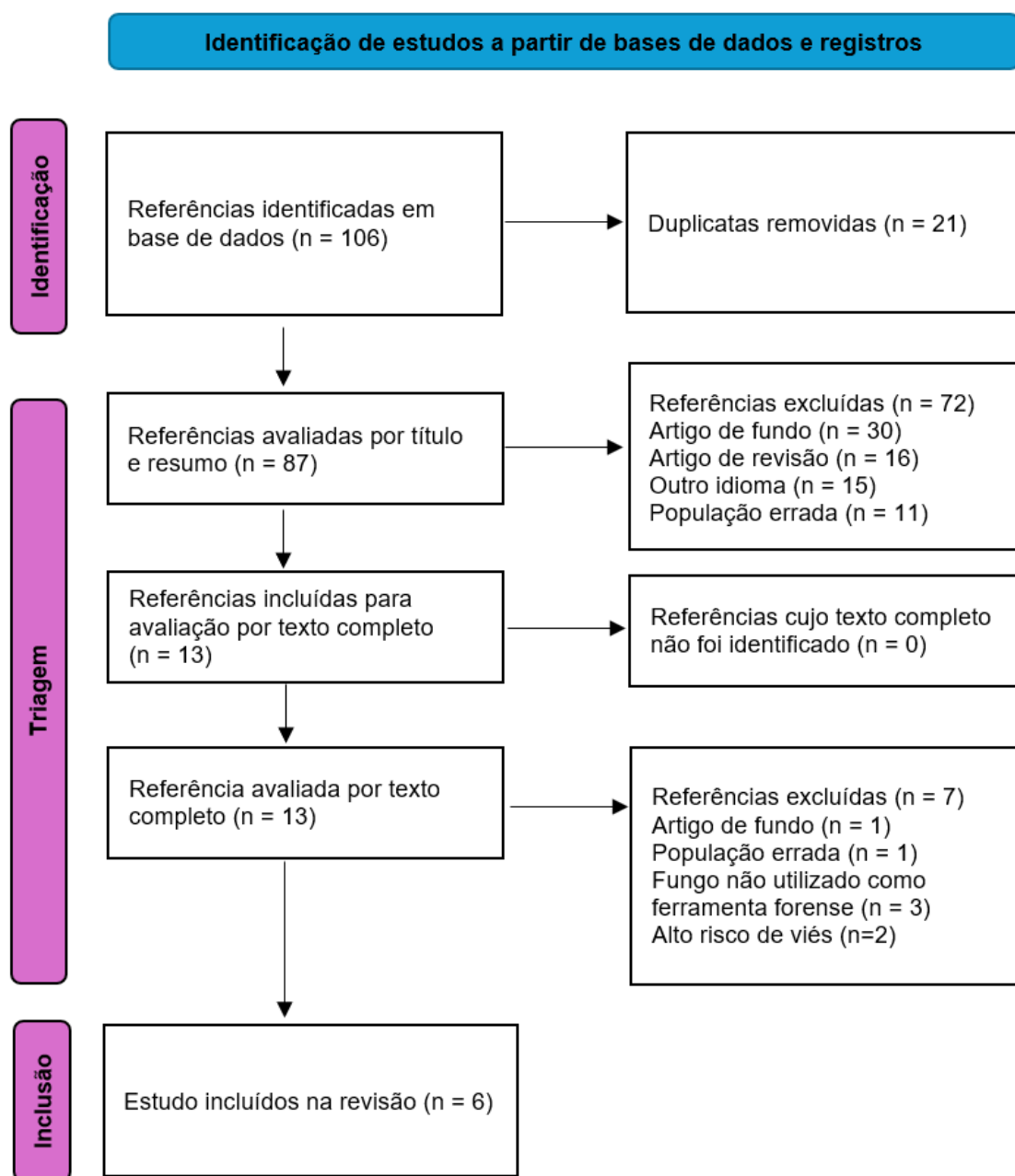
2.7. Avaliação do risco de viés

Para análise de risco de viés nos estudos individuais, seguiu-se o protocolo do Instituto Joanna Briggs (JBI) -Faculdade de Saúde e Ciências Médicas da Universidade de Adelaide (77). Essa análise foi realizada pelos autores separadamente, e os artigos foram classificados quanto ao risco de viés ser “não”, “sim” ou “não aplicável” para cada questão presente no protocolo, em todos os artigos incluídos. Para cada sim, foi atribuído um ponto, e os artigos com pontuação igual ou superior a 06 foram selecionados para esta revisão. Houve algumas limitações deste estudo, nomeadamente no que diz respeito à realização de uma metanálise. Na verdade, como os 6 estudos selecionados tinham objetivos e diferentes aplicações, este tipo de abordagem estatística não foi uma opção.

3. RESULTADOS

Foram identificados 106 registros de todas as bases de dados selecionadas até a fase da leitura na íntegra, que por meio da ferramenta Rayyan QCRI, foram importados para remoção das duplicadas e literatura por título e abstract. Após esta fase 13 estudos foram selecionados inicialmente e, em seguida, após ter acesso aos estudos em formato completo e leitura na íntegra dos mesmos, permaneceu o total de 08 artigos. Desses artigos, 6 apresentavam baixo risco de viés de análise e, portanto, foram incluídos na revisão (Figura 3, Tabela 2). Após essa etapa, os dados dos estudos foram extraídos para montagem da tabela de síntese de dados (Tabela 3).

Figura 3 - Diagrama de fluxo PRISMA



Legenda: Fluxograma das etapas desenvolvidas para a seleção de estudos primários que correspondem a pergunta foco da revisão sistemática.

Fonte: Adaptado e traduzido de PRISMA 2020 (78).

Tabela 2 - Análise de risco de viés.

	1. Os critérios de inclusão na amostra foram claramente definidos?	2. Os sujeitos do estudo e o ambiente foram descritos detalhadamente?	3. A exposição foi medida de forma válida e confiável?	4. Foram utilizados critérios objetivos e padronizados para medição da condição?	5. Foram identificados fatores de confusão?	6. Foram declaradas estratégias para lidar com fatores de confusão?	7. Os resultados foram medidos de forma válida e confiável?	8. Foi utilizada análise estatística adequada?	Avaliação geral
Voorde and Dijck (79)	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não aplicável	Sim	Não aplicável	Excluído
Kato <i>et al.</i> , (67)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não aplicável	Incluído
Filho <i>et al.</i> , (80)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não aplicável	Incluído
Sidrim <i>et al.</i> , (61)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não aplicável	Incluído
Beckett <i>et al.</i> , (81)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não aplicável	Incluído
Hitosugi <i>et al.</i> , (71)	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não aplicável	Excluído
Martinez-Ramirez <i>et al.</i> , (62)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Incluído
Piazza <i>et al.</i> , (82)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Incluído

Nota: Os artigos foram classificados quanto ao risco de viés ser “não”, “sim” ou “não aplicável” para cada questão presente no protocolo, em todos os artigos incluídos.

Para cada sim, foi atribuído um ponto, e os artigos com pontuação igual ou superior a seis foram incluídos nesta revisão.

Tabela 3 - Síntese da informação obtida nos artigos em análise.

Artigo	Ano	População	Local	Objetivo principal do estudo	Principais gêneros encontrados	Método de avaliação fúngica	Principais descobertas
Kato <i>et al.</i> , (67)	2023	2 Cadáveres	Dentro de um carro na floresta e em uma montanha (500m de altitude)	Discutir a possibilidade da análise de fungos isolados de cadáveres em casos forenses.	<i>Penicillium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp.	Cultura, identificação bioquímica e análise da região ITS do rRNA.	O ambiente influencia diretamente em quais fungos irão se desenvolver no cadáver. Além disso, conhecendo a dinâmica do desenvolvimento do fungo identificado, é possível estimar, minimamente, um IPM.
Filho <i>et al.</i> , (80)	2010	12 cadáveres; 12 adultos; 4 crianças pré-púberes loiras.	Universidade do estado do Ceará	Investigar o teste de perfuração in vitro utilizando <i>Trichophyton mentagrophytes</i> em cabelos de cadáveres adultos no período <i>post mortem</i>	Não aplicado	Cultura e teste de perfuração do fio	A perfuração do fio foi positiva em todos os cadáveres, sendo detectada entre o 12º e o 14º dia após a exposição ao fungo, indicando um potencial correlação com o período gasoso de decomposição do cadáver. Sugerindo o possível uso do <i>T. mentagrophytes</i> como um marcador do intervalo de morte em investigações.

Artigo	Ano	População	Local	Objetivo principal do estudo	Fungos encontrados	Método de avaliação fúngica	Principais descobertas
Sidrim <i>et al.</i> , (61)	2010	34 cadáveres (inchaço); 6 cadáveres (putrefação); 20 cadáveres (esqueletização)	Necrotério e cemitérios (Ceará)	Investigar a presença de fungos durante três estágios de decomposição humana: inchaço, putrefação e esqueletização	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Trichosporon</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Acremonium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. e <i>Trichoderma</i> sp.	Exame direto da amostra, cultura e testes bioquímicos	O exame micológico direto da amostra possui valor insignificante para identificação fúngica. Fatores ambientais e individuais dos cadáveres podem afetar o crescimento fúngico. Os fungos filamentosos foram mais presentes na fase de inchaço e esqueletização, já as leveduras, na de putrefação. Colônias de <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp. podem ser responsáveis por não ter sido isolado fungos demáceos nas análises. Regiões do corpo externas foram mais propícias para o crescimento fúngico que as internas.
Becktell <i>et al.</i> , (81)	2022	2 cadáveres	Estação de Pesquisa de Investigaçã o Forense	Analisar a presença de fungos em cadáveres dessecados e verificar se podem ser utilizados como indicadores do intervalo <i>post-mortem</i> .	<i>Aureobasidium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp. (<i>Ulocladium</i> spp.), <i>Didymella</i> spp.	Cultura e sequenciamento das regiões LSU, SSU e ITS	Os fungos estão envolvidos na decomposição humana a longo prazo em ambientes áridos. A presença destes fungos tão tardiamente nos processos de decomposição sugere que eles podem ser úteis para prever intervalos post-mortem de longo prazo.

Artigo	Ano	População	Local	Objetivo principal do estudo	Fungos encontrados	Método de avaliação fúngica	Principais descobertas
Martinez-Ramirez <i>et al.</i> , (62)	2013	105 cadáveres	Autópsia (Alemanha)	Isolar e identificar fungos que compõe a microbiota post-mortem de cadáveres	<i>Candida</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp., <i>Circinella</i> sp., <i>Coroliopsis</i> sp., <i>Enterocarpus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. e <i>Trichoderma</i> sp.	Cultura e biologia molecular	A diversidade fúngica foi maior em amostras coletadas imediatamente após a autópsia. O armazenamento a -20°C reduziu o número de cepas fúngicas viáveis. A presença de fungos comuns na microflora humana normal, bem como de fungos ubíquos, foi observada em amostras post-mortem, sugerindo a possível influência na concentração ou padrão metabólico de drogas.
Di Piazza <i>et al.</i> , (82)	2018	2 cadáveres	Necrotério	Analisar a colonização fúngica corporal dos cadáveres durante 6 semanas no necrotério.	<i>Penicillium</i> sp. e <i>Cladosporium</i> sp.	Monitoramento da área da colônia usando ImageJ por 6 semanas. Avaliação cromática das colônias. Cultura.	Condições ambientais post-mortem e perimortem podem interferir no desenvolvimento fúngico.

O estudo de Kato *et al.*, (67) enfatiza a importância de identificar fungos em cadáveres para estudos forenses, sugerindo seu papel em fornecer evidências vestigiais, estimar o tempo desde a morte e auxiliar nas investigações da cena do crime. Para isso, o crescimento de colônias fúngicas foi observado nos corpos de dois cadáveres encontrados ao ar livre, com fungos específicos como *Penicillium commune*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Mucor* sp. e *Pestalotiopsis* sp.. A identificação desses fungos ajudou a estimar o tempo desde a morte, determinar os intervalos post-mortem e compreender as condições ambientais que cercam os corpos, destacando o potencial do uso de fungos como ferramenta forense. Além disso, a consistência entre os tipos de fungos encontrados nos cadáveres e as condições ambientais em que os corpos foram descobertos sugere a relevância da análise fúngica nas investigações forenses, fornecendo informações valiosas sobre as circunstâncias da morte e auxiliando na reconstrução da cena do crime.

O estudo de Sidrim *et al.*, (61) ressalta a importância de novas pesquisas para estabelecer a análise da microbiota fúngica como uma ferramenta de rotina na ciência forense, semelhante ao papel estabelecido da entomologia em tais investigações. Para isso, utiliza procedimentos micológicos convencionais, incluindo exame direto e análises macro/micromorfológicas e bioquímicas, para analisar amostras de cadáveres humanos decompostos. A coleta de amostras é feita em vários locais do corpo, como boca, reto, vagina, sob o prepúcio, pele, cabelo, pulmões e restos esqueléticos, usando técnicas estéreis para exame direto e cultura. Em relação a caracterização do ambiente do ambiente do cadáver na fase de esqueletização, coletou-se amostras de roupas, fragmentos de caixões e solo de sepultura para análise no laboratório. Com isso, o trabalho investiga a presença de fungos em cadáveres humanos decompostos, identificando, principalmente, os gêneros de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Candida* em diferentes estágios de decomposição.

O estudo de Martínez-Ramírez *et al.*, (62) teve como objetivo identificar fungos em material post-mortem usando sequenciamento de DNA. Para isso, o fungo foi isolado e identificado por meio da morfologia e da análise molecular usando técnicas de PCR (Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase chain reaction*) e sequenciamento. O resultado foi um total de 156 cepas de fungos de 28 espécies e 15 gêneros isoladas de amostras post-mortem, sendo os gêneros *Candida*, *Penicillium* e *Rhodotorula* mais comuns. Sendo as cepas fúngicas mais prevalentes em amostras de pulmão e rim, indicando uma conexão com o meio ambiente, em relação as amostras de sangue, fígado e coração. Além disso, a diversidade de fungos isolados aumentou com o estágio de decomposição, sugerindo que alguns fungos entraram no corpo após a morte.

No estudo de Beckett *et al.*, (81) o objetivo foi analisar a presença de fungos em cadáveres dessecados e verificar se poderiam ser utilizados como indicadores de intervalo post-mortem em estágio avançado de decomposição. Para isso, o trabalho analisou crescimento fúngico em cadáveres presentes há mais de 3 anos, na Estação de Pesquisa de Investigação Forense (FIRS) em Whitewater, Colorado, por meio de observações morfológicas, dados de sequência de rDNA nuclear e análises filogenéticas. O estudo identificou três fungos demáceos, *Aureobasidium melanogenum*, *Didymella glomerata* e *Alternaria* spp., nos restos humanos desidratados em um ambiente de alto deserto, contribuindo para a compreensão da decomposição em estágio avançado e dos intervalos post-mortem de longo prazo.

O estudo de Filho *et al.*, (80) explorou o uso de *Trichophyton mentagrophytes* para um teste de perfuração capilar em cadáveres adultos, sugerindo seu potencial como marcador forense para estimar o intervalo post-mortem. Para isso, conduziu-se um teste *in vitro* de perfuração capilar usando *T. mentagrophytes* em amostras de cabelo de cadáveres adultos durante o período post-mortem, comparando os resultados com controles positivos (cabelos de crianças pré-púberes) e negativos (cabelos adultos saudáveis). A análise microscópica foi realizada para avaliar a presença de áreas perfuradas nas amostras de cabelo, particularmente com foco na medula capilar e no córtex. O estudo também utilizou *Trichophyton rubrum* como controle negativo para validar a especificidade de *T. mentagrophytes* para perfuração capilar nas amostras testadas. Os resultados foram perfurações positivas de *T. mentagrophytes* observadas em amostras de cabelo de cadáveres e crianças, enfatizando que as amostras de cabelo de cadáveres e crianças expostas a *T. mentagrophytes* mostraram perfurações entre 12-14 dias para crianças e 13-14 para cadáveres, enquanto cabelos adultos saudáveis e cabelos inoculados com *T. rubrum* não exibiram perfurações, indicando a utilidade potencial de *T. mentagrophytes* na ciência forense para determinar a hora da morte.

O estudo de Di Piazza *et al.*, (82) analisa a colonização fúngica em cadáveres ao longo de 6 semanas, mostrando diferenças significativas nos padrões de colonização devido às condições *perimortem*, sugerindo o uso do desenvolvimento de colônias de fungos para estimar o intervalo post-mortem e destaca o impacto das configurações *perimortem*. Para isso, a colonização fúngica foi monitorada em cadáveres durante 6 semanas em condições controladas e a identificação dos fungos foi feita por exame microscópico direto das estruturas fúngicas no cadáver, com colônias monitoradas semanalmente. Ao observar o desenvolvimento e a maturação de fungos em cadáveres em condições controladas, o estudo destaca o potencial das colônias de fungos como indicadores de condições post-mortem e *perimortem*, auxiliando na estimativa do intervalo post-mortem. Além disso, cadáveres em decomposição são colonizados

por vários organismos, como insetos, bactérias e fungos, compreender o conjunto de organismos e seus padrões de colonização por meio de estágios de decomposição é essencial para uma estimativa precisa do intervalo *post-mortem*.

3.1. Fungos estão presentes nos cadáveres humanos

No geral, todos os estudos selecionados demonstram que a micologia tem potencial para ser utilizada em uma investigação forense, uma vez que, os fungos estão comumente presentes nas fases de putrefação do cadáver, sendo pelo fato de pertencer a microbiota humana ou mesmo por ser um organismo presente nos mais diversos e extremos tipos de ambientes (80,82).

No entanto, por ser uma área recente e ainda pouco difundida, falta-se compreender melhor os diversos fatores que interferem na análise dos fungos, bem como estipular uma padronização no processamento fúngico em relação a área forense. Principalmente em relação à descrição dos estágios de decomposição dos cadáveres que os estudos analisam e às condições ambientais e climáticas que os fungos estavam antes de serem coletados e transportados para o laboratório. Por exemplo, o trabalho de Sidrim *et al.*, (61) descreve o estado de decomposição dos cadáveres pela terminologia utilizada na área forense, enquanto o trabalho de Martínez-Ramírez *et al.*, (62) descreve os dois grupos de cadáveres encontrados como “moderadamente decompostos” e “severamente decompostos”. Esta diferença na padronização dos termos empregados, prejudica o entendimento da análise da sucessão fúngica em relação as 4 etapas da putrefação: cromática, gasosa, coliquativa e esqueletização (83). Sendo um problema visto que cadáveres em diferentes estágios de decomposição podem ter uma microbiota fúngica diferente (84).

3.2. Não há padronização nas coletas e processamentos laboratoriais

Outra problemática é a falta de padronização no local da coleta, visto que em Sidrim *et al.*, (61), isola-se poucas colônias de *Candida* spp. em amostras de pele, cabelos, pulmonares,

sendo mais presentes em amostras de mucosas. Já em Martínez-Ramírez *et al.*, (62), foram oitenta e nove *Candida* spp em diferentes amostras de sangue, pulmão, fígado e sangue. Considerando que as *Candida* spp. são fungos comumente encontrados na microbiota dos indivíduos e, em pacientes imunocomprometidos, apresentam capacidade de transmigrar para os vasos sanguíneos e atingir outras regiões do corpo (85,86). Sugere-se que essa levedura consiga realizar o mesmo processo durante o processo de decomposição, devido à ausência dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

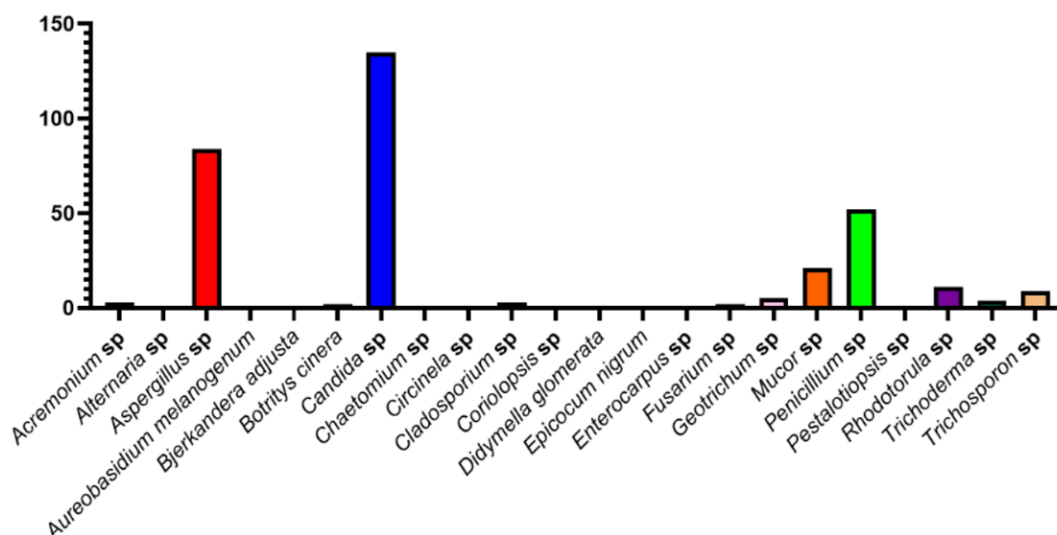
Além disso, outra diferença dos trabalhos de Sidrim *et al.*, (61) e Martínez-Ramírez *et al.*, (62) é a presença de fungos do gênero *Aspergillus*, enquanto no primeiro isola-se 80 cepas, no segundo foram apenas 4. Considerando que em ambos os trabalhos não se buscou inibir o crescimento desse gênero no semeio da cultura, chama a atenção essa diferença numérica. Uma hipótese levantada neste trabalho é que o sítio da coleta influenciou diretamente nesse achado, pois enquanto o trabalho de Sidrim *et al.*, (61) isola os fungos de amostras de pele, cabelo, mucosas e pulmão, o grupo Martínez-Ramírez *et al.*, (62) isola de sangue, pulmão, rins e fígado. Essa diferença se coaduna com o fato desse fungo filamentoso ser um contaminante anemófilo, cujo esporo, inicialmente, deposita-se em uma superfície exposta a microbiota aerófila, como pele, para poder se fixar, colonizar e iniciar a decomposição do substrato e, no decorrer do desenvolvimento da colônia fúngica, dissemina-se para os órgãos internos. Essa explicação pode ser aplicada também para a diferença observada nos números de isolados de *Penicillium* spp., uma vez que em Sidrim *et al.*, (61) teve-se 32 isolados, em Martínez-Ramírez *et al.*, (62) foram 17. Além disso, é importante considerar que essa diferença pode ter influência no fato dos fungos relatados em ambos os trabalhos, serem de cadáveres reportados em estágios de decomposição diferente.

3.3. Fungos hialinos são os mais encontrados em cadáveres humanos

Dos 6 trabalhos selecionados, foram relatados um total de 341 cepas fúngicas. Sendo os gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium* e *Mucor* os fungos mais encontrados nos trabalhos que analisaram microbiota *post-mortem* (61,62,67,82) (Gráfico 1). Um resultado esperado e compatível com outras revisões literárias, visto que os fungos filamentosos *Aspergillus* spp.,

Penicillium spp. e *Mucor* spp. são ubiqüitários e as leveduras do gênero *Candida*, são fungos colonizadores da microbiota de pele e mucosas (60).

Gráfico 1 - Total de fungos identificados nos artigos.

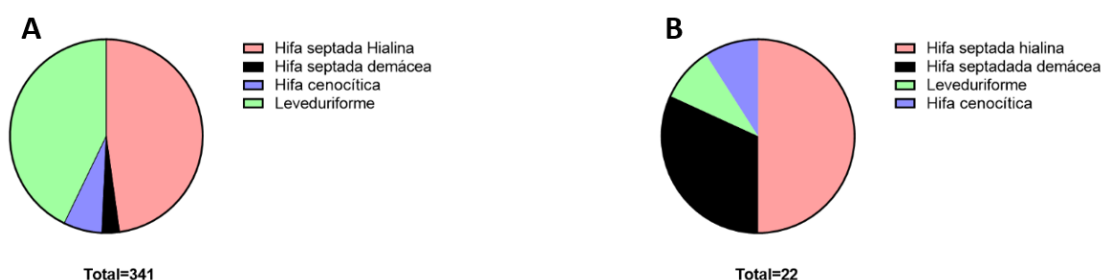


Legenda: Gráfico de barras mostrando a frequência de gêneros fúngicos identificados nos artigos analisados.

Fonte: GraphPad Prism 5.

Agrupando essas cepas fúngicas de acordo com suas estruturas somáticas, ou seja, separando-as em 4 grupos, a prevalência foi respectivamente de fungos de hifas septadas hialinas (47,80%), leveduriformes (42,81%), de hifas cenocíticas (6,45 %) e, por último, de hifas septadas demáceas (2,93%) (Gráfico 2A). No entanto, em relação a diversidade dos gêneros isolados (no total, 22 gêneros), os fungos de hifa septada demácea são o segundo grupo mais prevalente (7 gêneros), sendo o primeiro mais prevalente, os de hifa septada hialina (11 gêneros) e, por último, empatados, os de hifa cenocítica (2 gêneros) e os leveduriformes (2 gêneros) (Gráfico 2B).

Gráfico 2 - estruturas somáticas das cepas fúngicas relatadas.



Legenda: A - estruturas somáticas das cepas fúngicas relatadas; B - estruturas somáticas dos gêneros fúngicos relatados.

Fonte: GraphPad Prism 5.

Com relação a quantidade de fungos de hifa cenocíticas (6,45%), esse achado corrobora com o que é descrito na literatura, que coloca esses fungos aparecendo geralmente em estágios mais avançados da decomposição. Sugerindo que se houvesse mais trabalhos focados em estágios mais avançados de decomposição, provavelmente essa prevalência de fungos de hifas cenocíticas seria maior.

Já em relação aos fungos leveduriformes, apesar de serem bastante prevalentes totalizando 146 cepas isoladas, apenas 2 gêneros foram relatados, *Candida* spp. (principalmente, a espécie *C.albicans*) e *Rhodotorula* spp.. O interessante dessa informação é que essas leveduras, comumente, pertencem a microbiota, colonizando a pele e mucosas humanas (87). Sugerindo que esses fungos estavam presentes na fase *antemortem* e *perimortem*.

3.4. O impacto do ambiente e o estado de decomposição interferem na microbiota *post-mortem*

A quantidade de fungos demáceos isolados foi maior quando comparado com fungos hialinos e leveduriformes em apenas um artigo, que, de forma intrigante, também foi o único a analisar colônias fúngicas em cadáveres expostos a ambiente árido e longo período de decomposição (81). Nesse trabalho, todos os fungos encontrados foram demáceos, *Aureobasidium melanogenum*, *Didymella glomerata* e *Alternaria* spp., sugerindo que os fungos que apresentam pigmentação de melanina na parede celular estejam mais presentes em estágios mais avançados de decomposição. O real motivo para isso ocorrer ainda é desconhecido, mas no trabalho Sidrim *et al.*, (61) uma hipótese levantada é que devido ao fato dos fungos melanizados apresentarem, comumente, um desenvolvimento mais lento, os fungos hialinos conseguem se estabelecer com mais facilidade nas primeiras etapas da decomposição. E, após as colônias se estabelecerem e atingirem a fase de declínio do crescimento, é que os fungos demáceos conseguiriam se fixar e desenvolver no cadáver. Outra explicação possível é o fato dos fungos melanizados serem mais aptos a ambientes áridos, pois, geralmente, apresentam maior resistência a ambientes não favoráveis, tais como altas temperaturas, diferentes pHs,

radiação, ambientes poluídos e, no caso dos fungos de importância médica, a capacidade de evadir da resposta do hospedeiro (88).

Além de Beckett *et al.*, (81), o trabalho de Kato *et al.*, (67) indica que o ambiente é um fator que pode interferir diretamente nos fungos que irão se desenvolver no cadáver. Uma vez que nesses trabalhos, condições ambientais, como a temperatura e a umidade, contribuíram para o desenvolvimento dos fungos que foram isolados dos corpos em decomposição. Esse achado corrobora com o que é visto na literatura, reforçando a necessidade de se haver um detalhamento na descrição das condições em que o cadáver e a cena do crime foram encontrados, incluindo temperatura e umidade do local (60).

3.5. Fungos patogênicos não foram encontrados em cadáveres humanos

Em nenhum dos trabalhos selecionados relatou fungos patogênicos, ou seja, fungos que causam infecção primária em pacientes imunocompetentes (89), sendo recuperados de uma amostra cadavérica (61,62,67,81,82). Incluindo o trabalho de Filho *et al.*, (80), pois apesar de usar o *Trichophyton mentagrophytes*, que é um fungo patogênico, como modelo experimental, esse fungo foi retirado de uma coleção de cultura e não isolado de uma amostra forense. Esse fato é interessante, pois corrobora com outros trabalhos na literatura em relação a micologia forense, em que os fungos mais isolados são os considerados oportunistas, isto é, fungos ambientais que conseguem estabelecer infecções secundárias em pacientes imunocomprometidos (47).

Uma explicação para essa ocorrência pode ser o fato de que fungos patogênicos, principalmente os termodimórficos, serem normalmente de regiões endêmicas específicas. Por exemplo, *Coccidioides* spp., que habita o solo da região desértica dos EUA (87) e *Sporothrix* complexo *schenckii*, que se encontra no solo e em materiais vegetais de regiões da América Latina, como o Rio de Janeiro (90). Dificultando o acesso desses fungos ao local que os cadáveres se encontravam e reduzindo a chance de serem isolados. Outra hipótese que poderia explicar essa ausência de fungos patogênicos no isolamento, o seu lento desenvolvimento em relação aos fungos oportunistas. Visto que fungos como *Aspergillus* spp. normalmente apresentam colônias maduras dentro de 3 a 5 dias, o *Histoplasma* spp. pode demorar até 120 dias para ser recuperado de uma amostra clínica (91). Com isso, mesmo que estejam presentes

no cadáver, podem ter seu crescimento prejudicado quando precisam competir espaço e nutriente com fungos oportunistas que apresentam uma rápida maturação.

3.6. A micologia forense utiliza técnicas recicladas da micologia médica

Importante mencionar que em todos os trabalhos, apesar do foco ter sido em micologia forense, as técnicas de isolamento e identificação fúngica foram semelhantes às da micologia médica (Quadro 1) (47,89).

Quadro 1 - Técnicas utilizadas em cada artigo.

Autores	Técnicas			
	Cultura	Testes fenotípicos	Biologia molecular	Exame direto da amostra
Sidrim <i>et al.</i> , (38)	+	+	+	+
Filho <i>et al.</i> , (57)		+		
Martinez-Ramirez <i>et al.</i> , (39)	+		+	
Di Piazza <i>et al.</i> , (59)	+		+	+
Beckett <i>et al.</i> , (58)	+		+	
Kato <i>et al.</i> , (44)	+	+	+	

Nota: +: técnica utilizada no artigo.

Fonte: Autoria própria.

Todos os artigos selecionados utilizaram como técnica de identificação fúngica a análise microscópica do fungo a partir do isolamento em cultura. Além disso, apenas com exceção de Filho *et al.*, (80), também realizaram análise a partir de biologia molecular. Testes fenotípicos, como provas bioquímicas, foram realizados, principalmente em fungos leveduriformes, pois não é possível, na maioria das vezes, identificar esses fungos apenas pela análise morfológica (47,92,93). Apenas Filho *et al.*, (80) utilizou o teste de perfuração do fio de cabelo para análise, porém era a técnica mais adequada para atingir o objetivo do trabalho.

Dos 6 trabalhos selecionados, apenas 3 mencionaram realizar exame direto da amostra (61,80,82). No entanto, nos 3 trabalhos a análise desse teste foi diferente, em Di Piazza *et al.*, (82), o exame direto da amostra era para confirmar que não houve contaminação durante o

período que o fungos se desenvolveu no cadáver; em Filho *et al.*, (80) foi para analisar a profundidade da perfuração causada pelo fungo no fio de cabelo para se chegar a uma estimativa de intervalo post-mortem; e em Sidrim *et al.*, (61) o objetivo era analisar se as estruturas fúngicas eram visualizadas na amostra, mesmo que não fosse possível visualizar a olho nu as colônias fúngicas crescidas no cadáver. No entanto, diferente da micologia médica cujo processamento é considerado padrão-ouro, na micologia forense é considerado um exame pouco proveitoso. Isso porque a microbiota bacteriana influenciou diretamente na qualidade do exame não sendo possível uma boa visualização de estruturas vegetativas do fungo nas amostras cadavéricas.

Cinco dos seis artigos selecionados utilizaram a análise da cultura fúngica para isolar os fungos e, para confirmar os fungos a nível de espécie, foi realizado biologia molecular (62,67,81,82). Testes fenotípicos, como provas bioquímicas, foram mais empregadas para identificação de fungos leveduriformes (61,67), uma vez que as leveduras apresentam poucas estruturas morfológicas, diferente dos fungos filamentosos que apresentam alta diversidade de estruturas reprodutivas que permitem que sejam caracterizem a nível de gênero (89). Apesar disso, em Filho *et al.*, (80) a técnica principal aplicada foi a perfuração do fio, que é um teste fenotípico, no entanto, a proposta do artigo não era identificar o fungo, mas sim determinar se era possível estimar o intervalo post-mortem a parti do tamanho da perfuração cônica encontrada no fio do cabelo.

Em relação a cultura, na maioria dos trabalhos foi empregado SDA com acréscimo de inibidores bacterianos, como cloranfenicol, vancomicina e Polimixina B, porém não foi relatado o uso de meios com inibidores para fungos ambientais. Por um lado, inibindo as bactérias, permitiu-se que houvesse isolamento de uma maior variedade de fungos ambientais na amostra cadavérica. No entanto, a falta de inibidores para esses tipos de fungos limita a interpretação ao fato de que em nenhum artigo ter sido isolado fungos dimórficos e dermatófitos. Isso porque fungos ambientais, no geral, desenvolvem-se mais rápido e, muitas das vezes, confluem no meio, impedindo que fungos de crescimento mais tardio consigam se desenvolver.

3.7. O congelamento das amostras fúngicas interfere na diversidade fúngica presente

O trabalho Martínez-Ramírez *et al.*, (62) expõe um achado relevante, no trabalho os autores coletam diferentes amostras de 105 cadáveres, uma parte dessas amostras seguiam diretamente para a análise micológica e outras eram congeladas. As que foram congeladas e depois passavam por análises toxicológicas e por fim micológicas. Notou-se que as amostras congeladas quando passavam pelas metodologias micológicas, isolava-se menos fungos quando comparadas com o grupo de amostras que foi diretamente para a análise micológica. Sugere-se então que se coletada uma amostra com fim, exclusivamente micológico, tente-se não congelar e proceder com a análise o mais rápido for possível, a fim de perder o mínimo possível da diversidade fúngica que esteja na amostra.

3.8. As condições *perimortem* podem influenciar na microbiota *post-mortem*

Um achado relevante da revisão foi a conclusão do trabalho de Di Piazza *et al.*, (82), em que as condições *perimortem* também podem influenciar o intervalo *post-mortem*. Isso porque o cadáver que faleceu em casa, ambiente não controlado, apresentou uma colonização em toda a região da face depois do tempo estipulado, já o cadáver que veio a óbito em um ambiente hospitalar, que estava em um ambiente minimamente controlado e, provavelmente, utilizando antimicrobianos, no mesmo período que o primeiro cadáver, apresentou apenas uma colônia na região do palato e após 6 semanas mais uma na parte direita interna da boca. Esses resultados mostram que o ambiente *perimortem* possui uma importância sobre como irá ocorrer o crescimento fúngico no cadáver. Sugere-se então que se deve levar em consideração o ambiente onde a pessoa morreu, na hora de se analisar e avaliar o crescimento fúngico no cadáver.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo realizou uma revisão sistemática para analisar como o uso de fungos presentes em cadáveres humanos pode auxiliar como ferramenta útil para resolução de casos judiciais, tendo selecionado 06 artigos, a maioria deles com aplicação experimental.

Em geral, quando se tem avaliado a micologia forense como uma possível ferramenta em casos criminais, a maioria dos autores que suportam esta hipótese se vale de estudos baseados em práticas analisadas na entomologia e palinologia forense, pois a micologia forense ainda é uma área recente e pouco conhecida (59,60,94). Para se ter uma ideia de como está a produção científica sobre este tema, este trabalho revisou as evidências científicas já publicadas sob a área.

Esta revisão visava a inclusão de artigos a partir de 1980, mas somente foram obtidos artigos a partir do ano de 2010 em diante, o que demonstra que a análise do crescimento fúngico em cadáveres humanos é um tema científico recente, o que explica a inexistência de revisões sistemáticas sobre o tema até o momento. No entanto, para a realização de uma revisão sistemática, é necessária a produção prévia de um corpo de evidência suficiente para a síntese dos resultados. No momento, com 6 artigos selecionados, foi possível realizar uma primeira revisão exploratória da questão.

Houve viés no trabalho, causado pela exclusão de 15 artigos publicados em idiomas que não eram o inglês, espanhol ou português. No entanto, esta é revisão sistemática exploratória, cujos resultados produziram um levantamento inicial descritivo sobre o uso da micologia forense em cadáveres humanos.

Os artigos apresentaram uma proporção considerável de lacunas de informação. Por exemplo, em termos de técnicas laboratoriais, observa-se que não há padronização da metodologia empregada para o isolamento dos fungos a partir da amostra cadavérica. Uma vez que os autores utilizaram meios de cultura acrescidos de antibióticos, como Vancomicina e Polimixina B, para inibir o crescimento bacteriano. Todavia, com exceção de Sidrim *et al.*, (61), que utilizou meios com cicloheximida, não utilizaram meios com inibidores de fungos ambientais, como *Aspergillus* spp.. Além disso, apesar de Kato *et al.*, (67) e Sidrim *et al.*, (61) mencionaram a necessidade de incubar as culturas em temperaturas mais altas para dificultar o crescimento de fungos do gênero *Penicillium*, favorecendo o desenvolvimento de fungos de crescimento mais lento, nenhum trabalho mencionou realizar essa técnica.

Dado que a produção científica sobre o tema é relativamente recente, observa-se que a maioria dos artigos até o momento adotou delineamentos descritivos, não sendo aplicável realizar métodos estatísticos. Portanto, nota-se uma necessidade de aplicação do escopo de evidências disponíveis sobre o tem, que ainda requer estudos originais sobre o tema. Nota-se a necessidade de inclusão de evidências com melhor qualidade metodológica, visto que, 2 artigos em 8 apresentavam qualidade metodológica baixa ou pobre.

É interessante o fato de que o tema ganhou destaque a partir do ano de 2010, porém ainda há poucos trabalhos dedicados à área. Sendo considerado, pela maioria dos autores, como uma das maiores problemáticas, o desconhecimento das técnicas que podem ser aproveitadas a partir da análise do desenvolvimento fúngico e sua biologia, levando os profissionais a descartarem os fungos como evidências a serem analisadas. E mesmo quando separados para análise, fatores que influenciam na qualidade da amostra não são amplamente comentados, como o crescimento de fungos contaminantes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostras fúngicas

As cepas fúngicas de *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus* spp., *Curvularia* spp. e *Candida albicans* foram utilizadas neste estudo. Para confirmar a identidade dessas cepas, usou-se como critério a análise morfológica das culturas por meio da observação das colônias nas placas de Petri e na visualização microscópica das estruturas vegetativas e reprodutivas de fungos filamentosos em microscópio óptico após o microcultivo em lâmina, empregando lâmina e lamínula e líquidos de montagens comerciais como o lactofenol com azul de algodão para fungos filamentosos hialinos e leveduriformes e o lactofenol de Aman para fungos filamentosos demáceos. Além disso, uso de chromagar *Candida* (Kasvi, Paraná, Brasil), teste do tubo germinativo e produção de clamidósporos em ágar milho + tween 80 para confirmação da levedura.

5.2. Meios de cultura usuais em laboratórios de micologia

Os meios de cultura utilizados foram o SDA, PDA e ágar infusão cérebro-coração (BHIA) (Kasvi, Paraná, Brasil). O preparo desses meios seguiu as informações contidas nas instruções técnicas ou bulas, em que consiste que determinada quantidade do meio em pó seja suspendida em água destilada, homogeneizada e dissolvida por aquecimento e frequente agitação, em seguida seja distribuída em recipientes apropriados e esterilizada em autoclave a 121° C por 15 min.

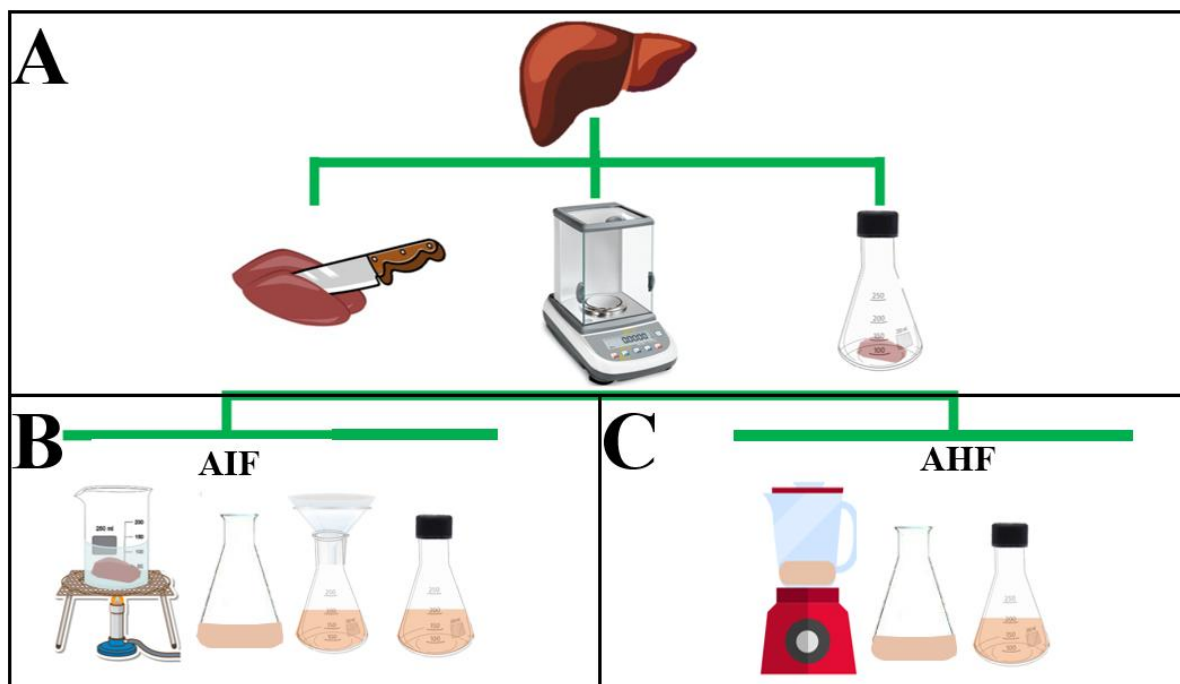
5.3. Meios de cultura a base de fígado de frango

Os meios de cultura foram confeccionados a partir de peças de açougue de frango congeladas, adquiridas no comércio varejista. Essas peças de açougue foram descongeladas, fatiadas, pesadas assepticamente em balança de precisão e acondicionadas, em pequenas porções, em frascos estéreis do tipo *Erlenmeyer*, fechados com rolha de borracha, e armazenados a temperatura de -20° C, em freezer (Figura 4A). Para o preparo desses utilizou-se ágar-ágar comercial (Kasvi, Paraná, Brasil). Dois tipos de meios foram confeccionados, um ágar-infusão de peças de açougue e um ágar homogenato de peças de açougue.

A composição do meio ágar infusão de fígado (AIF) preconizada foi de 300g de fígado de frango e 15g de ágar-ágar para 1000 mL de água destilada e o modo de preparo seguiu a seguinte processamento: As porções armazenadas em frascos do tipo *Erlenmeyer* foram descongeladas, pesadas e transferidas para um Becker, onde se acrescentou água destilada até imergir todas as alíquotas das peças e, em seguida, realizou-se a cocção dessa mistura a 100° C até levantar fervura (aproximadamente, 10 min.). Após esse processo, a infusão foi tamizada em gaze dobrada 4 vezes para um frasco do tipo *Erlemeyer* e o ágar-ágar foi dissolvido de acordo com a orientação do fabricante. Em seguida, o meio foi transferido para uma proveta a fim de completar a mistura com a quantidade de água destilada desejada e distribuído em garrafas para a esterilização (Figura 4B).

Em relação ao meio ágar homogenato de frango (AHF), a composição preconizada foi de 15g de fígado de frango e 15g de ágar-ágar para 1000 mL de água destilada e o modo de preparo foi semelhante, a única diferença foi que as porções armazenadas em frascos do tipo *Erlenmeyer* foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas com água destilada em um liquidificador por 1 min. antes de ser tamizado em gaze dobrada 4 vezes para um frasco do tipo *Erlemeyer* (Figura 4C).

Figura 4 - Preparo dos meios a base de peça de açougue.



Legenda: A - Preparo e acondicionamento das alíquotas de fígado de frango; B - Preparo do meio AIF; C – Preparo do meio AHF.

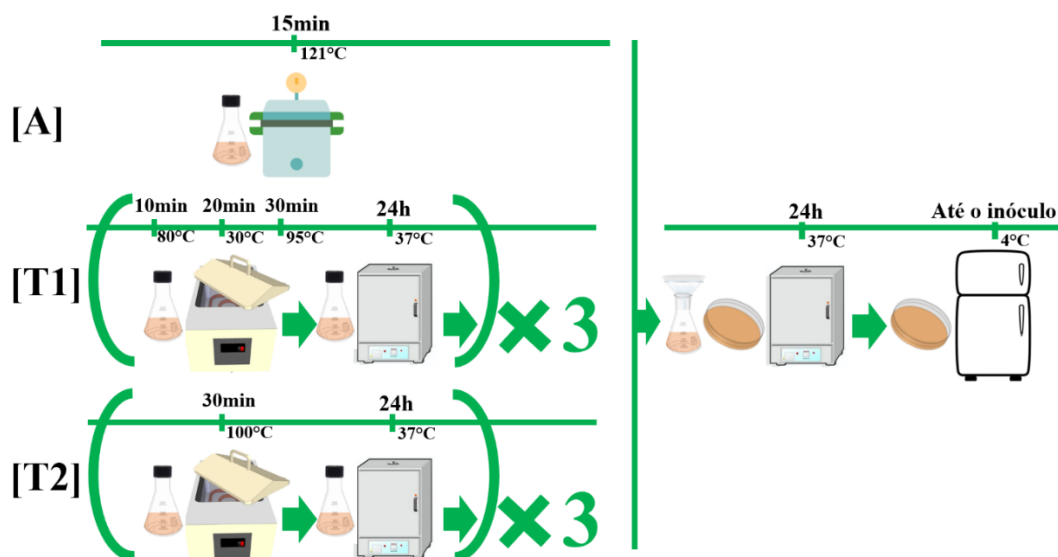
Fonte: Autoria própria

5.4. Esterilização dos meios de cultura a base de fígado de frango

Os dois meios, após serem distribuídos em garrafas, foram divididos em 3 grupos, nos quais cada grupo sofreu um processo de esterilização diferente dos outros.

Grupo 1 [A] foi autoclavado a 121° C por 15 min. e depois dividido em placas de Petri autoclavadas, sendo encubadas a 37°C por 24h e, em seguida, armazenadas sob refrigeração a 4° C (Figura 5). Grupo 2 [T1] sofreu tindalização com 3 ciclos de 80°C por 10 min., 30°C por 30 min., 95°C por 20 min., sendo incubado por 24h a 37°C, e, no último ciclo, foi dividido em placas de Petri autoclavadas, sendo encubadas a 37°C por 24h e, em seguida, armazenadas sob refrigeração a 4° C (Figura 5). Grupo 3 [T2] sofreu tindalização com 3 ciclos de 100°C por 30 min., sendo incubado por 24h a 37°C, e, no último ciclo, foi dividido em placas de Petri autoclavadas, sendo encubadas a 37°C por 24h e, em seguida, armazenadas sob refrigeração a 4° C. Antes de verter os meios em placas de Petri, os meios foram filtrados com gaze autoclavada dobrada em 4 partes (Figura 5) (95–97).

Figura 5 - Esterilização dos meios a base de extrato proteico.



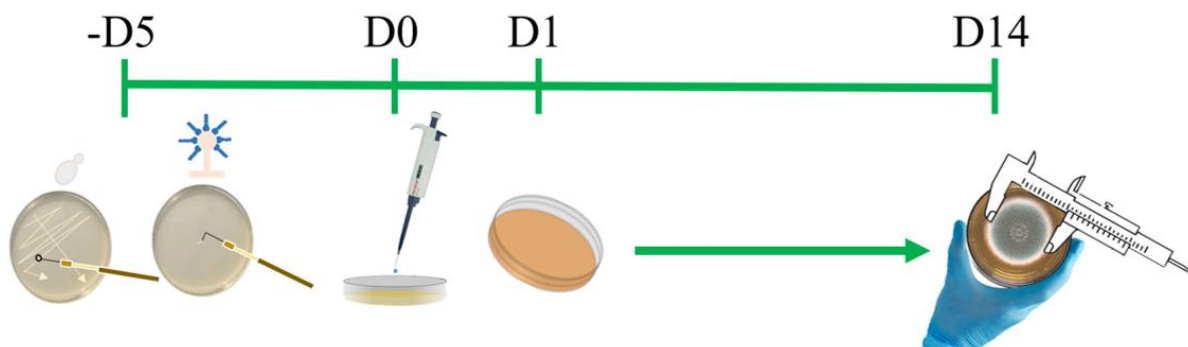
Legenda: AIF e AHF foram submetidos a 3 tipos de esterilização: autoclavação [A] (1 ciclo de 121°C/1atm por 15min), tindalização 1 [T1] (3 ciclos de 80°C por 10min, 30°C por 20min, 95°C por 30min e 37°C por 24h) e tindalização 2 [T2] (3 ciclos de 100°C por 30min e 37°C por 24h); e no final do processo, todos os meios foram filtrados, vertidos em placas de Petri, colocados na estufa à 37°C por 24h e depois armazenados na geladeira à 4°C até o dia do inóculo.

Fonte: Autoria própria

5.5. Inóculo fúngico

O inóculo foi padronizado de acordo com o protocolo M51A do CLSI (98). Resumidamente, a cultura fúngica foi diluída em solução salina para corresponder à concentração 0,5 da escala McFarland e, em seguida, inoculada 10 µL da suspensão no centro da placa com meio de cultura sólido. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a temperatura de 35 °C (Figura 6).

Figura 6 - Inóculo e medição do diâmetro das colônias fúngicas.



Legenda: Os fungos foram semeados separadamente em PDA por 5 dias. Após esse período, cada fungo foi ressuspensionado em água destilada estéril até atingir a escala 0,5 McFarland e, em seguida, foi inoculado 10 μ L dessa suspensão nos centros das placas de Petri de diferentes meios de cultura. Esses meios foram SDA, PDA, BHIA, AHF e AIF. A análise do crescimento fúngico foi por meio de leituras visuais e medições com paquímetro ou régua, procedidas durante 14 dias após a inoculação dos fungos. Todo o processo foi fotografado.

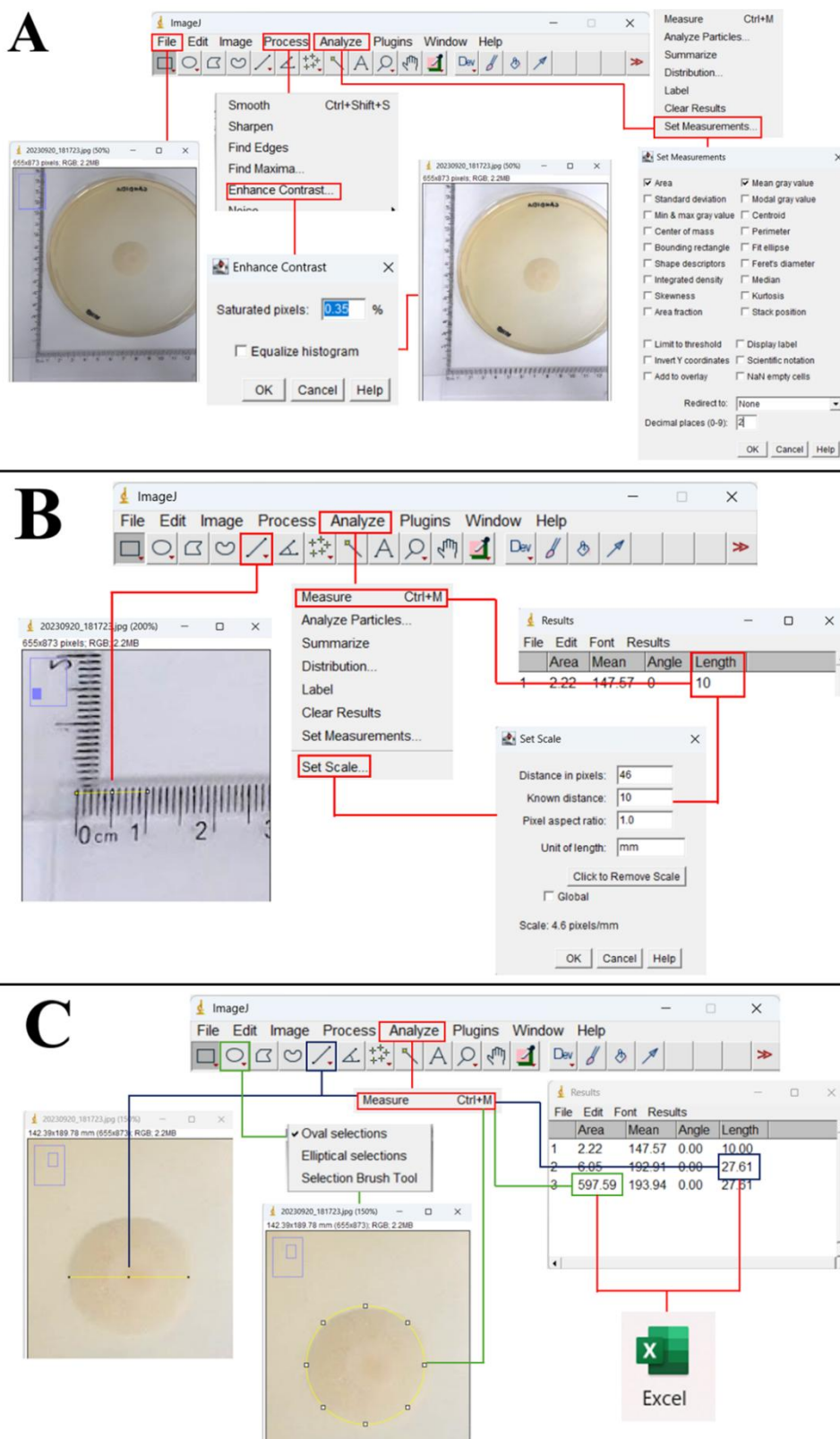
Fonte: Autoria própria

5.6. Medição do diâmetro e área das colônias fúngicas

A medição do diâmetro das colônias fúngicas foi realizada uma vez por dia durante um intervalo de 14 dias, iniciando-se no dia do inóculo fúngico, por meio de leituras visuais com o uso de um paquímetro digital (Figura 6) e, antes de serem colocadas novamente na estufa, todas as colônias foram fotografadas. Para quantificar a área das colônias, foi realizada análise dessas colônias fotografadas por meio do *software* ImageJ (<https://imagej.net/ij/>) e agrupadas numa tabela do Excel (Figura 7). No *software* ImageJ as fotos foram carregadas e analisadas individualmente. Primeiramente, foi carregada a imagem com o formato JPG e processada de maneira a aumentar o contraste para facilitar a marcação da área, por meio da sequência de instruções do ImageJ: “File” > “Open” > “Arquivo salvo na pasta” > “Process” > “Enhance contrast” > “Saturated pixed: 0,35%” > “OK” (Figura 6A). Em seguida, para confirmar que a área será analisada, é necessário realizar os seguintes comandos: “Analyze” > “Set Measurements” > clicar em “Area” (Figura 7A). Todas as fotos analisadas foram tiradas com uma régua próximo as placas de Petri, pois no ImageJ é preciso fazer a conversão de pixels para milímetros. Por meio do comando “*shaight*” que gerou uma reta que foi colocada na escala determinada na foto. Em seguida, clicou em “Analyze” > “Set Scale” > “Known distance: 10” > “Unit of lenght: mm” > “OK” (figura 7B). Para confirmar que a quantidade de pixels correspondia à medida em milímetros, realizou-se o seguinte comando: “Analyze” > “Mensure”

ou “Ctrl + M” que gerou uma tabela com o comprimento da reta gerada pelo comando “*shaight*” (Figura 6B). Após essas etapas, realizou-se a análise das colônias fúngicas, para o diâmetro foi feito os comandos: “*shaight*” > “*Analyse*” > “*Mensure*” ou “Ctrl + M”, gerando uma tabela com o comprimento do diâmetro, e, para analisar a área, utilizou-se o comando: “*Oval*” > “*Oval selections*” > “*Analyse*” > “*Mensuare*” ou “Ctrl +M”, gerando uma tabela com a área da figura selecionada (figura 6C). No caso de colônias irregulares, além do “*oval selections*”, utilizou-se o “*Selection brush tool*”. Ao final das análises, os resultados foram exportados para o *software* Excel Microsoft 365 para a confecção das tabelas e dos gráficos (figura 7C) (82,99,100).

Figura 7 - Análise das fotografias com o ImageJ.



Legenda: A - A análise do crescimento fúngico por meio da análise de diâmetro e área da colônia por meio do ImageJ, procedidas durante 14 dias após a inoculação dos fungos. Tratamento da imagem para melhorar o contraste e especificar o que será medido; B - Processo para converter de pixel para milímetro; C - Medição do diâmetro e área das imagens e exportar os resultados para o Excel.

Fonte: <https://imagej.net/ij/>

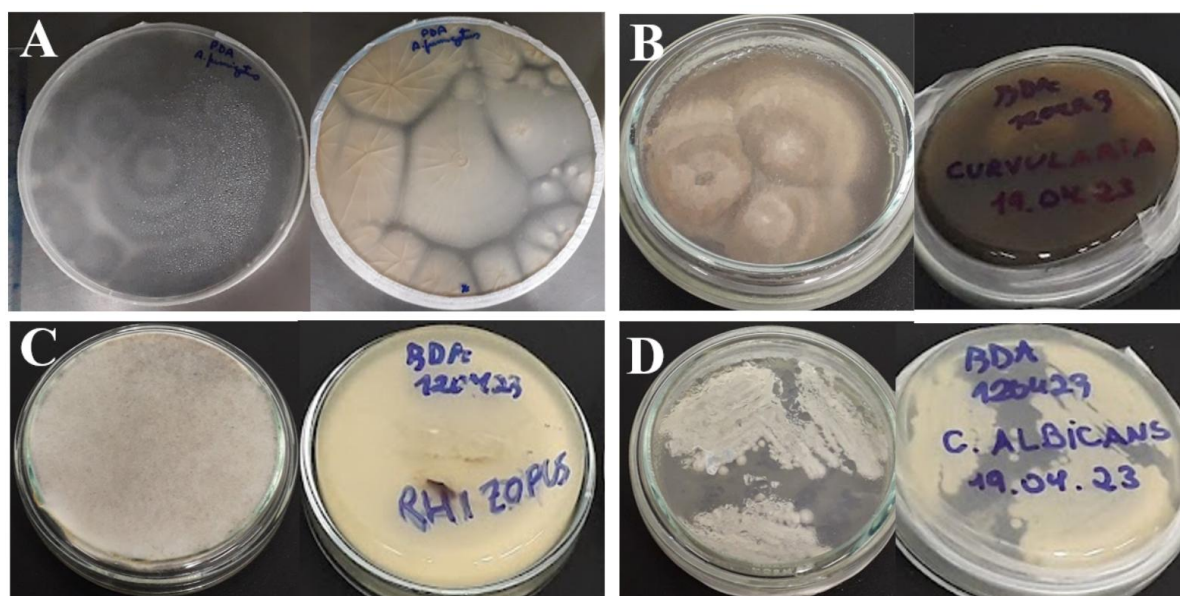
6. RESULTADO

A escolha das espécies fúngicas deste trabalho foi baseada no que tem sido reportado na literatura com relação à possibilidade de uso como indicadores de IPM e tempos de deposição de cadáveres. Os principais fungos recuperados em situações criminais são normalmente sapróbios, queratinolíticos e/ ou leveduriformes oriundos de contaminação ambiental ou microbiota (60,70,101). Com o cuidado de ter fungos leveduriformes, de hifas asseptadas (ou cenocíticas) e de hifas septadas (ou apocíticas) hialinas e demáceas, respectivamente representados por *Candida albicans*, *Rhizopus* sp., *Aspergillus fumigatus* e *Curvularia* sp. (89,93).

Importa mencionar que os fungos, principalmente os filamentosos, são analisados em relação ao exame macroscópico da cultura, que é a observação direta das colônias crescidas na placa de Petri, e ao exame microscópico da cultura, que é a observação das estruturas vegetativas e reprodutivas no microscópio (47,89). Apesar da microscopia ser fundamental para identificar os fungos a nível de gênero, a macroscopia é uma análise simples que traz bastantes informações em relação as colônias presentes na placa de Petri, uma vez que as colônias fúngicas podem ser analisadas inicialmente pela observação do anverso e reverso da placa de Petri (45,102).

A placa de Petri pode ser dividida de acordo com a presença de meio de cultura em duas áreas: reverso, onde há meio de cultura, e anverso, em que não há meio de cultura. Ambos trazem informações relevantes em relação a cultura porque no reverso, devido à trama formada pelo ágar do meio de cultura, dificilmente produz estruturas reprodutivas, estando presente apenas as estruturas vegetativas do fungo, que podem sinalizar se esse fungo apresenta melanina ou não na parede celular de suas células ou mesmo se esse fungo é produtor de determinados pigmentos (87,89). Já o anverso, como é uma região da placa com bastante espaço para o desenvolvimento de estruturas reprodutivas, pode-se analisar a influência direta dessas estruturas, sendo possível observar a textura, topografia, forma, margem e até mesmo a coloração, pois os esporos fúngicos apresentam colorações muito diferentes entre gêneros e até mesmo entre espécies. Essas análises corroboram para indicar as principais características da colônia fúngica e, principalmente, para observar a presença de colônias puras ou mistas (45,47,89). Devido a isso, para garantir que não houve contaminação antes e após os experimentos e eram colônias puras, as cepas fúngicas foram submetidas a análises do exame macroscópico da cultura (Figura 8A,B,C,D).

Figura 8 - Confirmação das cepas fúngicas a partir da macroscopia das culturas.

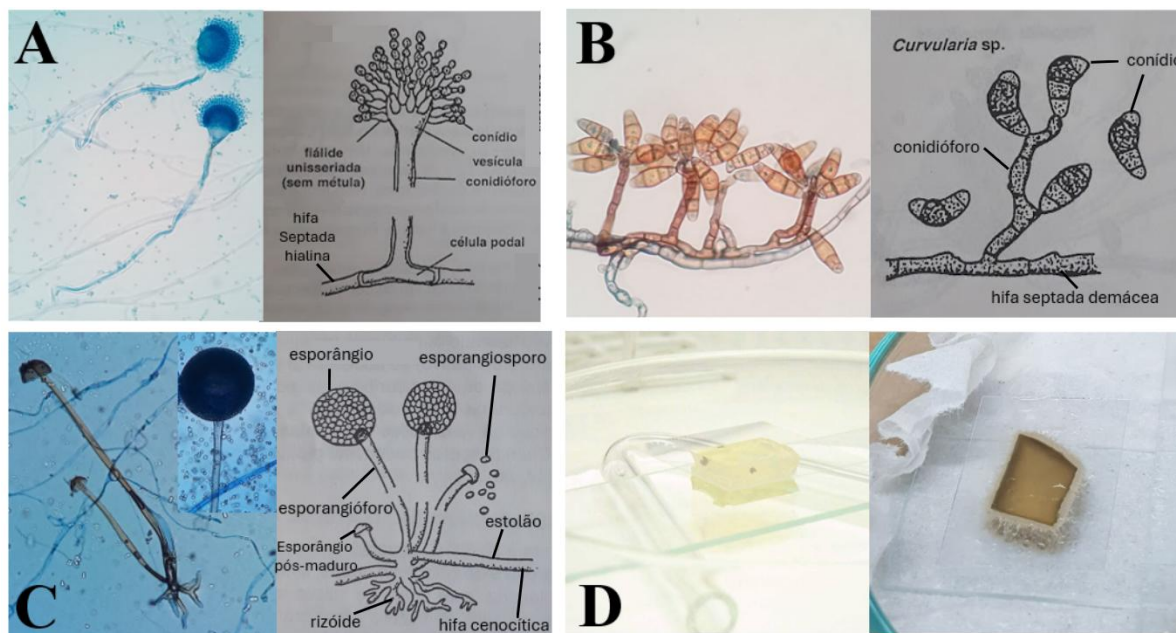


Legenda: A - Anverso (esquerda) e reverso (direita) da cultura de *Aspergillus fumigatus* ; B - Anverso (esquerda) e reverso (direita) da cultura de *Curvularia* spp.; C - Anverso (esquerda) e reverso (direita) da cultura de *Rhizopus* spp.; D - Anverso (esquerda) e reverso (direita) da cultura de *Candida albicans*.

Fonte: Autoria própria

Em relação ao exame microscópico da cultura, esse é fundamental para a identificação da maioria dos fungos filamentosos, quando a biologia molecular não é possível, sendo esse processo apoiado nas diferenças morfológicas das estruturas reprodutivas e no modo pelo qual os esporos são produzidos (ontogenia). Sendo duas técnicas as mais empregadas: o exame microscópico direto, em que um fragmento da cultura é retirado e colocado entre lâmina e lamínula com um líquido de montagem apropriado, e o cultivo em lâmina (ou microcultivo), em que o fungo se desenvolve diretamente na lamínula que será colocada entre lâmina com um líquido de montagem apropriado. Ambas as técnicas são utilizadas para observar no microscópio as estruturas vegetativas e reprodutivas com fungo com maior qualidade, porém como a técnica de microcultiva preserva melhor as estruturas fúngicas, tende a ser a mais utilizada para identificação dos fungos filamentosos (45,47,89,103). Com isso, a micromorfologia das cepas de fungos filamentosos utilizadas nos experimentos (Figura 9 A,B,C) foram analisadas por meio da técnica do microcultivo (Figura 9D).

Figura 9 - Confirmação das cepas fúngicas a partir da micromorfologia dos fungos filamentosos por meio da técnica de microcultivo.

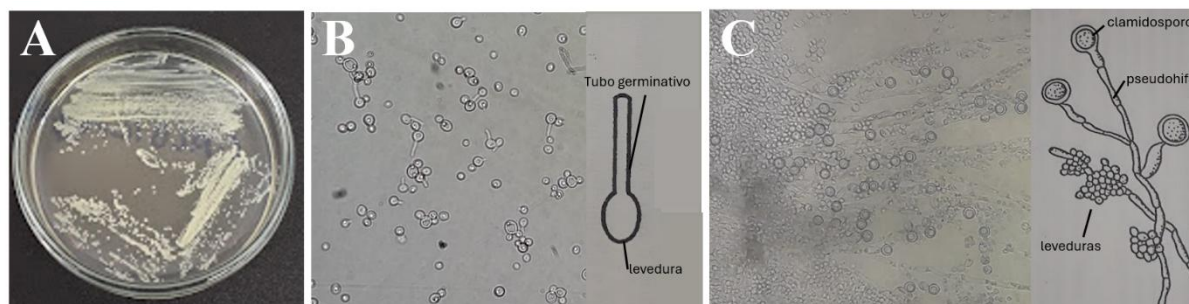


Legenda: A - Imagem (esquerda) e esquema (direita) da micromorfologia de um *Aspergillus fumigatus*; B – Imagem (esquerda) e esquema (direita) da micromorfologia de uma *Curvularia* sp.; C -). Imagem (esquerda) e esquema (direita) da micromorfologia de um *Rhizopus* spp.; D - Imagem de um microcultivo logo após ser montado (esquerda) e 7 dias após a montagem (direita).

Fonte: Esquemas adaptados de (89); Foto D cedida pelo Dr. Paulo Nelfeud; Fotos A, B e C de autoria própria.

Já para fungos leveduriformes, além da análise da macroscopia e microscopia das culturas, é preciso realizar técnicas complementares para identificar esses fungos. No caso, como no trabalho foi utilizado *Candida albicans*, foram utilizadas técnicas complementares para confirmação da pureza da colônia e a identidade desse fungo (89,93,102). A primeira foi semeá-lo em Chromagar *Candida*, pois uma característica desse meio cromogênico é que as colônias de *C.albicans* crescem esverdeadas (Figura 10A) (87). Em seguida, foi realizado a prova do tubo germinativo, que consistiu em inocular o fungo em soro humano e incubar a 37°C por 2-3 h para observar, entre lâmina e lamínula, se nessa suspensão houve formação de tubo germinativo, isso porque a cepa de *C.albicans* utilizada no projeto era tubo germinativo positivo (Figura 10B) (47). Por último, foi feito a prova da produção de clamidósporos (ou clamidoconídios), pois a cepa era produtora de clamidósporos quando semeada em ágar milho acrescido com Tween 80 (Figura 10C) (89).

Figura 10 - Confirmação da cepa fúngica leveduriforme *Candida albicans*



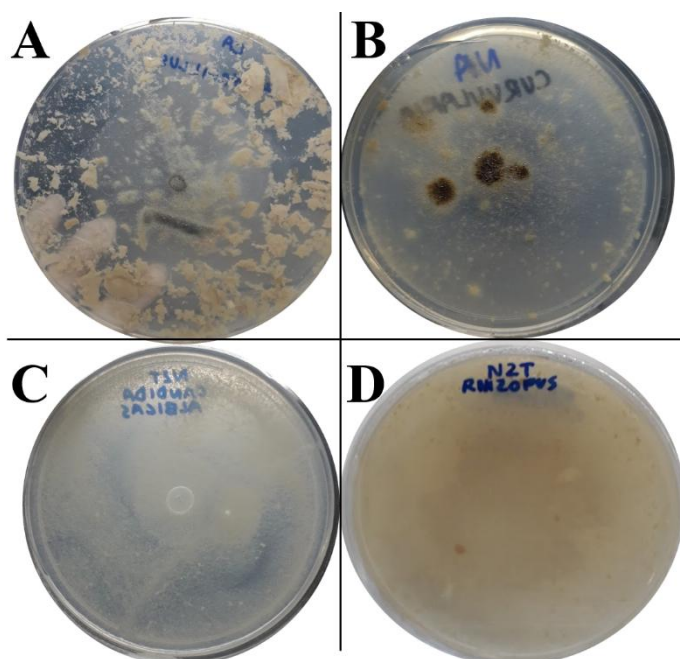
Legenda: A – Colônias verdes no Chromagar *Candida*; Imagem (esquerda) e esquema (direita) da prova do tubo germinativo positiva; C - Imagem (esquerda) e esquema (direita) da prova de produção de clamidósporos positiva.

Fonte: Esquemas adaptados de (89); Fotos de autoria própria.

6.1. AHF e AIF precisam ser filtrados antes de serem vertidos nas placas de Petri

Inicialmente o protocolo de preparo dos meios AHF e AIF foi baseado em protocolos já utilizados em laboratórios de microbiologia (102). Por isso, o meio AHF não sofreria nenhum processo de filtração e o meio AIF teria apenas uma filtração para separar a infusão que seria homogeneizada com a água e o ágar-ágar. No entanto, seguindo essa ideia, o resultado dos meios de cultura não foi satisfatório, uma vez que, independentemente da técnica de esterilização utilizada, formou-se muitos grumos nas placas de Petri. Essa questão além de prejudicar a estética do meio de cultura, dificultou a análise das colônias fúngicas crescidas nos meios por não conseguir visualizar com clareza a margem da colônia ou distinguir o fungo dos grumos presentes (FIGURA 11A, B,C,D).

Figura 11 - Crescimento fúngico nas placas dos meios de cultura que não foram filtrados antes de verter nas placas de Petri.

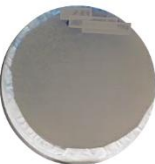
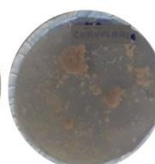
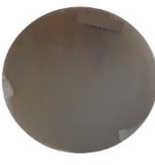
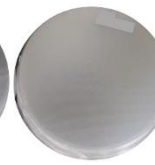
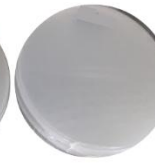


Legenda: A – Crescimento fúngico de *Aspergillus fumigatus* em um dos meios que sofreu processo de autoclavação; B - Crescimento fúngico de *Curvularia* sp. em um dos meios que sofreu processo de autoclavação; C - Crescimento fúngico de *Candida albicans* em um dos meios que sofreu processo de tindalização; D - Crescimento fúngico de *Rhizopus* sp. em um dos meios que sofreu processo de tindalização.

Fonte: Fotos de autoria própria.

Com isso, uma opção foi manter as etapas do preparo dos meios AHF e AIF, mas após os processos de esterilização do meio, foi adicionado uma etapa de filtração antes de verter o meio na placa de Petri. Essa filtração foi realizada dentro do fluxo laminar e com gaze e funil autoclavados para não comprometer a esterilidade dos meios de culturas. Com essa etapa a mais, os meios deixaram de formar grumos, facilitando a análise do crescimento fúngico nas placas de Petri (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado visual dos meios de cultura a base de extrato proteico.

	MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO					
	AHF [A]	AHF [T1]	AHF [T2]	AIF [A]	AIF [T1]	AIF [T2]
PREPARO SEM FILTRAR ANTES DE VERTER NA PLACA						
PREPARO FILTRANDO ANTES DE VERTER NA PLACA						

Fonte: Autoria própria

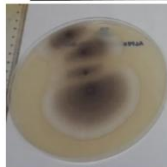
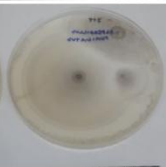
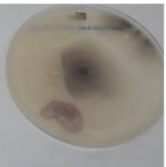
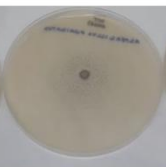
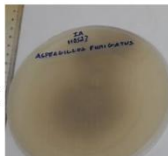
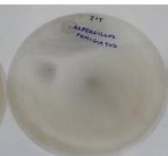
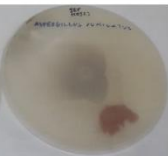
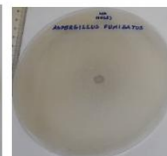
6.2. Diferentes processos de esterilização não interferem significativamente o crescimento fúngico nos meios de cultura

Considerando que o processo de autoclavação [A] pode afetar a presença de alguns micronutrientes e interferir de forma indireta no crescimento da colônia fúngica, optou-se por realizar outras duas técnicas de tinalização (104,105) nomeadas de [T1] e [T2] para analisar se haveria interferência no crescimento dos fungos nas placas de Petri.

Os resultados indicaram que não houve muita diferença visual entre os meios autoclavados e tinalizados, independente do fungo cultivado. Com isso os demais experimentos foram feitos apenas com os meios AIF e AHF autoclavados, pois é uma técnica mais rápida, simples e economia que as técnicas de tinalização, que além de terem etapas mais complexas, precisavam de no mínimo 3 dias para estarem prontas (Tabela 5, 6, 7, 8) (96,104).

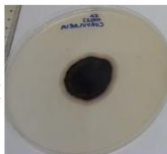
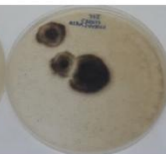
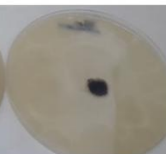
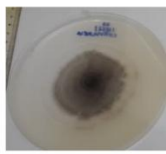
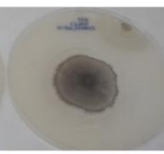
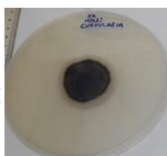
No entanto, notou-se que o crescimento fúngico apresentou diferenças em relação aos meios que AIF e AHF, indicando que a forma como o fígado foi processado para produzir o meio, homogenato ou infusão, poderia interferir no crescimento fúngico.

Tabela 5 - Resultado visual do crescimento colonial de *Aspergillus fumigatus* em meios com diferentes processos de esterilização.

MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO						
	AHF [A]	AHF [T1]	AHF [T2]	AIF [A]	AIF [T1]	AIF [T2]
ANVERSO DA PLACA DE PETRI						
REVERSO DA PLACA DE PETRI						

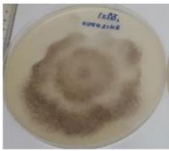
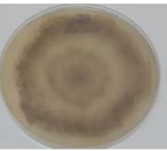
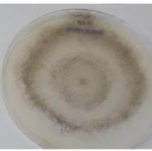
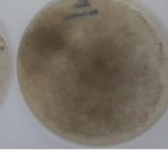
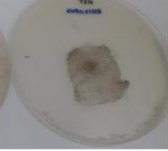
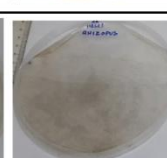
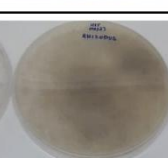
Fonte: Autoria própria

Tabela 6 - Resultado visual do crescimento colonial de *Curvularia* sp. em meios com diferentes processos de esterilização.

MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO						
	AHF [A]	AHF [T1]	AHF [T2]	AIF [A]	AIF [T1]	AIF [T2]
ANVERSO DA PLACA DE PETRI						
REVERSO DA PLACA DE PETRI						

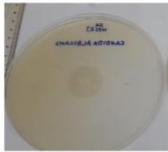
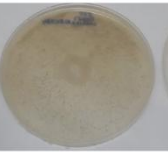
Fonte: Autoria própria

Tabela 7 - Resultado visual do crescimento colonial de *Rhizopus* sp. em meios com diferentes processos de esterilização.

		MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO					
		AHF [A]	AHF [T1]	AHF [T2]	AIF [A]	AIF [T1]	AIF [T2]
ANVERSO DA PLACA DE PETRI							
							

Fonte: Autoria própria

Tabela 8 - Resultado visual do crescimento colonial de *Candida albicans* em meios com diferentes processos de esterilização.

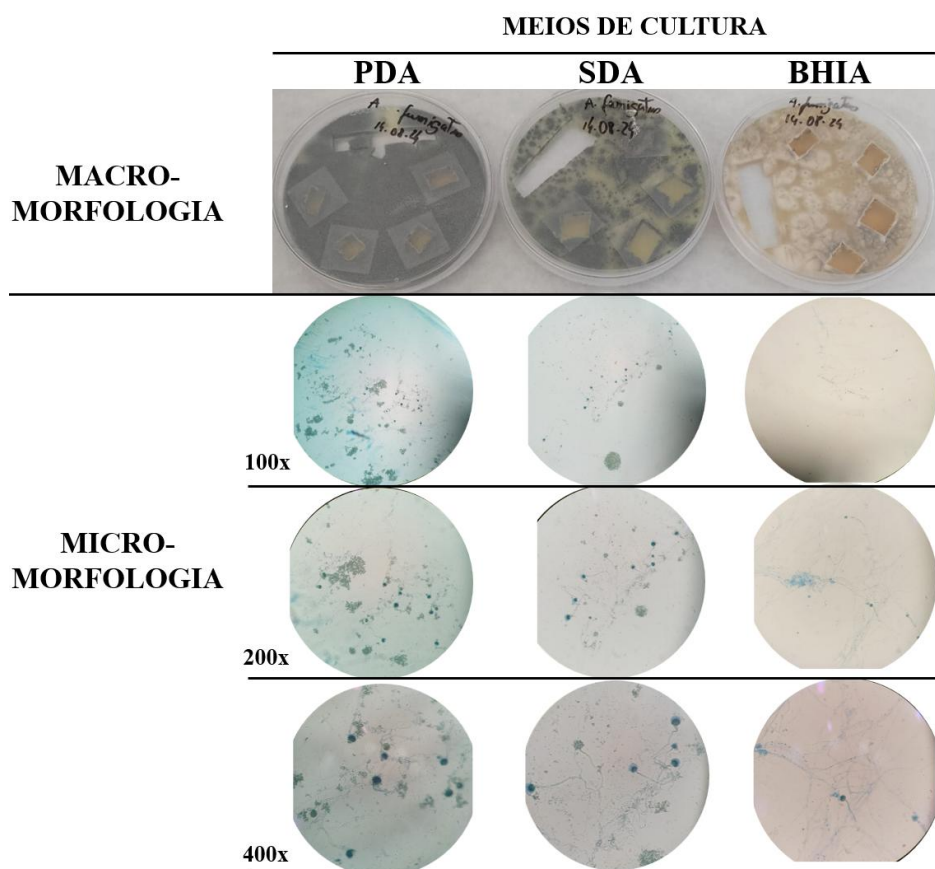
		MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO					
		AHF [A]	AHF [T1]	AHF [T2]	AIF [A]	AIF [T1]	AIF [T2]
ANVERSO DA PLACA DE PETRI							
							

Fonte: Autoria própria

6.3. A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de *Aspergillus fumigatus*

Inicialmente foi realizado um experimento para observar a diferença visual entre a colônia fúngica em diferentes meios de cultura utilizados na rotina de um laboratório de micologia clínica (PDA, SDA e BHIA) (Tabela 9), pois apesar do SDA ser bastante utilizado na prática forense, não há padronização de meios de cultura nessa área (59,60,65,66).

Tabela 9 - Análise da macromorfologia e micromorfologia de *Aspergillus fumigatus* em diferentes meios de cultura.



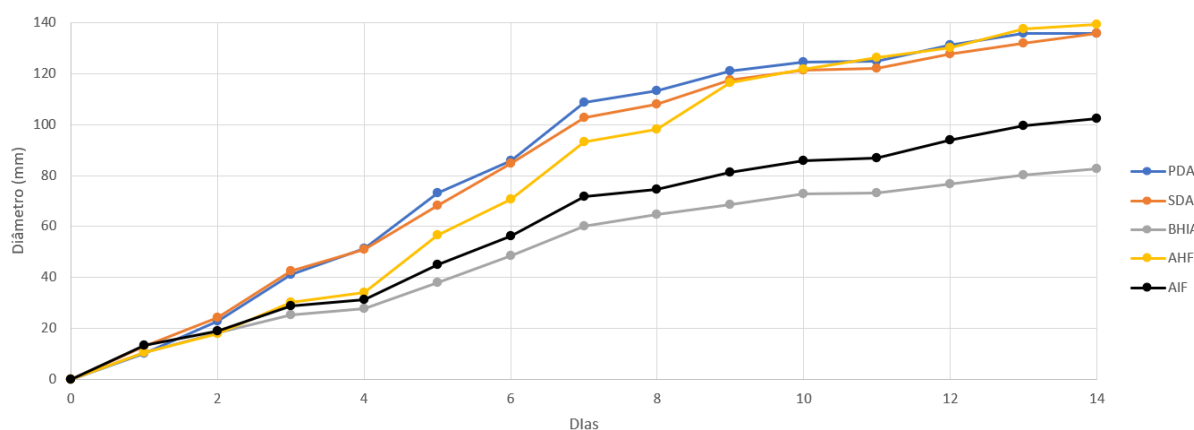
Fonte: Autoria própria

Observou-se que a macromorfologia e micromorfologia do crescimento fúngico de *Aspergillus fumigatus* foram diretamente impactadas pela diferença do meio em que foi semeado. Isso porque as colônias resultantes dos conídios inoculados no meio PDA apresentaram características diferentes quando comparada com as colônias que se desenvolveram no meio BHIA. Analisando a macroscopia e microscopia da cultura, é nítido que nos meios PDA e SDA favorecem a produção de estruturas reprodutivas diferente do que acontece no meio BHIA. Isso porque nas placas com PDA e SDA é possível avaliar que as culturas apresentam o reverso hialino e o anverso apresentam colônias que nos primeiros dias apresentaram coloração branca e, posteriormente, azul esverdeada a verde acinzentada, que é a cor característica dos esporos dessa espécie, indicando a maturidade da colônia (89). Já na placa com BHIA, o anverso da colônia permanece branco mesmo após 7 dias de incubação, indicando que a colônia ainda não atingiu o mesmo nível de maturação das outras placas.

Isso é confirmado na análise da microscopia dessas colônias, pois o microcultivo gerado das colônias crescidas em cada meio, demonstra que nos meios PDA e SDA há presença de muitas estruturas reprodutivas, principalmente esporos por todos os campos das lâminas. No entanto, no microcultivo das colônias crescidas no meio BHIA, quase não há presença de estruturas reprodutivas, incluindo esporos, mas é possível observar que as estruturas vegetativas são mais presentes quando comparadas nos outros meios.

Além disso, a análise do desenvolvimento fúngico nos meios de cultura PDA, SDA, BHIA, AIF e AHF, demonstram que os meios PDA e SDA apresentam maiores diâmetros, indicando que são os favoráveis ao crescimento de *A.fumigatus*; o meio AHF apresenta um crescimento significativo, próximo ao dos meios anteriores; e os meios BHIA e AIF possuem os menores valores de diâmetro, indicando serem os meios que induzem menor taxa de crescimento do *A.fumigatus* (gráfico 3)

Gráfico 3 - Crescimento fúngico medido em diâmetro do *Aspergillus fumigatus* ao longo de 14 dias.



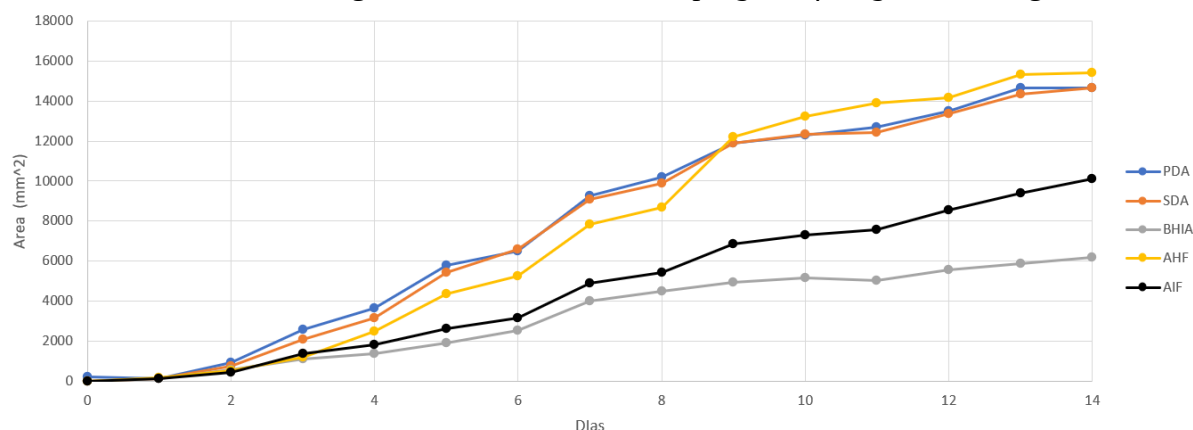
Fonte: Autoria própria.

Analisando o gráfico, observa-se que nos primeiros 4 dias, o crescimento é similar em todos os meios, indicando um período inicial de adaptação. No entanto, após esse período, os meios PDA, SDA e AHF apresentam um crescimento mais rápido, que começa a se estabilizar por volta do 10º ao 14º dia, indicando que o fungo atingiu a capacidade máxima permitida pelo meio. Já os meios BHIA e AIF crescem mais lentamente e não chegam à capacidade máxima permitida pelo meio mesmo no 14º dia (Gráfico 3).

Devido ao fato do *A.fumigatus* apresentar múltiplos pontos de esporulação na placa, principalmente nas placas com meios PDA e SDA, foi analisado a área total formada nas placas durante os 14 dias após o inóculo do fungo (gráfico 4), que corroborou com os resultados anteriores (Gráfico 3), em que o crescimento segue um padrão exponencial inicial que

desacelera nos últimos dias. Sendo o meio AIF o que apresenta o crescimento fúngico mais lento, enquanto nos meios PDA e AHF o crescimento fúngico chegou à capacidade máxima da placa.

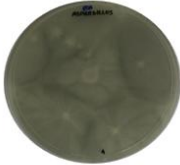
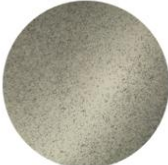
Gráfico 4 - Crescimento fúngico medido em área do *Aspergillus fumigatus* ao longo de 14 dias.



Fonte: Autoria própria.

Apesar de no meio AHF o crescimento fúngico ser próximo dos fungos nos meios PDA e SDA (Gráficos 3 e 4), uma análise da macroscopia das placas no 14º dia, principalmente uma análise no microscópio estereoscópio do centro e da borda das colônias, demonstra que as características colônias diferem muito entre os meios (Tabela 10).

Tabela 10 - Macroscopia das culturas de *Aspergillus fumigatus*.

	MACROSCOPIA		ESTEREOSCÓPIO	
	ANVERSO DA PLACA DE PETRI	REVERSO DA PLACA DE PETRI	CENTRO DA COLÔNIA	BORDA DA COLÔNIA
PDA				
SDA				
BHIA				
AHF				
AIF				

Fonte: Fotos de autoria própria.

As colônias crescidas nos meios PDA e SDA apresentam macromorfologias bastante parecidas, inclusive em relação a análise no microscópio estereoscópio do centro e da borda que se apresentam bem uniformes, pois a cultura já confluiu na placa. Já os meios BHIA e AIF, compartilham mais características em comum quando comparadas com os meios PDA e SDA. Principalmente na análise no microscópio estereoscópio, onde no centro das colônias há grande presença das estruturas fúngicas, diferente do que se é visualizado nas bordas das colônias. Corroborando com as características de um crescimento micelial ainda em desenvolvimento, em que o centro da colônia consiste na presença dos fungos mais senescentes, ou seja, onde haverá maior presença de estruturas maduras ou pós-maduras, e as bordas com mais presença de estruturas mais jovens, ou seja, presença de mais estrutura vegetativa que estruturas reprodutivas formadas (47,89). E, por fim, ao analisar o crescimento fúngico no meio AHF,

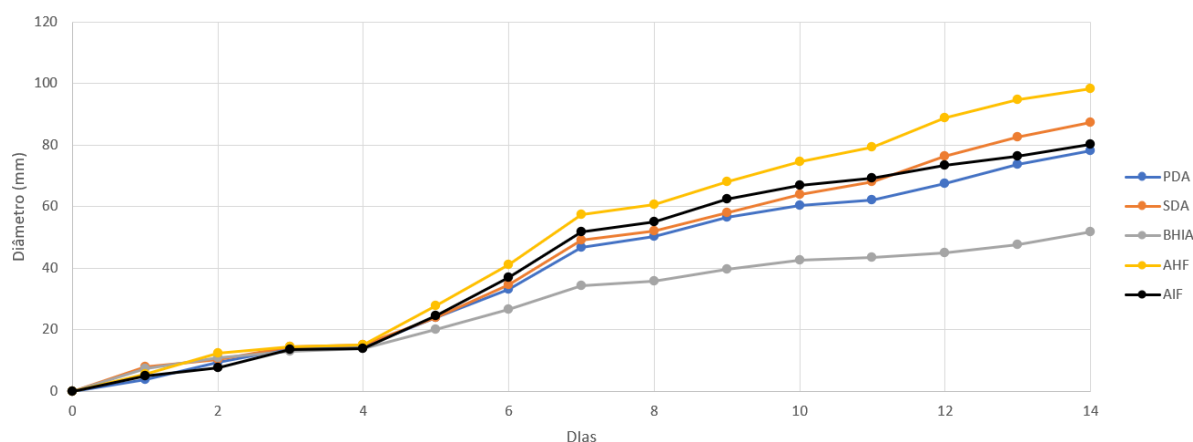
apesar de nos gráfico 3 e 4 indicarem que chegou a confluir o crescimento na placa de Petri, ao observar a colônia crescida no 14º dia após a inoculação (Tabela 10), percebe-se que o crescimento é principalmente micelial, com pouca produção de estruturas reprodutivas no centro da colônia.

6.4. A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de *Curvularia* spp.

Diferente do *A.fumigatus*, os fungos do gênero *Curvularia* apresentam uma taxa de desenvolvimento mais lento e não esporula com tanta facilidade, um padrão visto na literatura em boa parte dos fungos demáceos (20,89,106).

A análise do desenvolvimento fúngico nos meios de cultura PDA, SDA, BHIA, AIF e AHF, demonstram que o diâmetro das colônias aumenta com o tempo, seguindo um padrão quase linear após os primeiros dias e desacelera por volta do 13º dia (Gráfico 5). Um fato interessante é que as curvas do crescimento fúngico em cada meio apresentaram menor variação quando comparado com os do *A.fumigatus* (Gráfico 3). No entanto, em relação a *Curvularia* sp., o meio BHIA possui claramente o menor crescimento fúngico, enquanto os maiores crescimentos são visualizados nos meios AHF e SDA (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Crescimento fúngico medido em diâmetro do *Curvularia* sp. ao longo de 14 dias

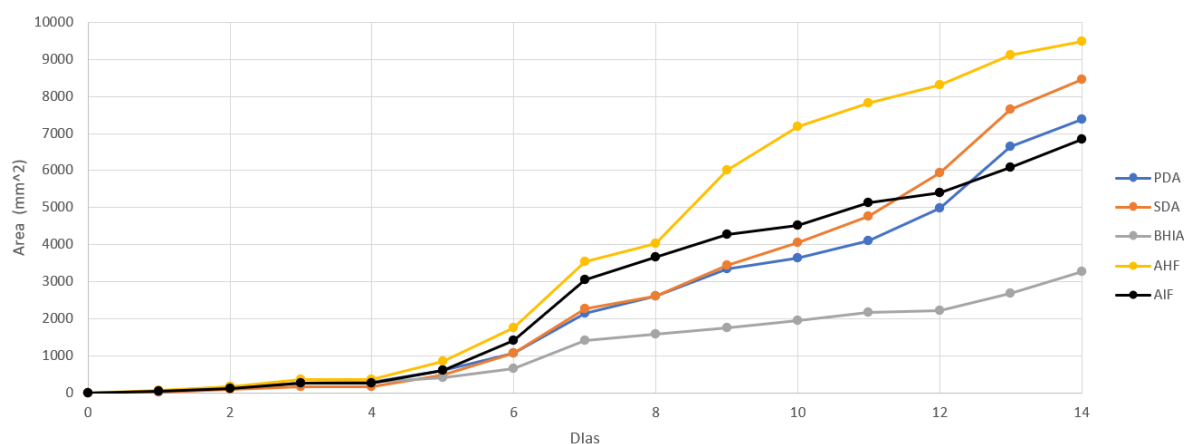


Fonte: Autoria própria.

Observa-se que nos primeiros 4 dias, o crescimento é similar em todos os meios (Gráfico 5), indicando um período inicial de adaptação, o que é visto também em relação ao *A.fumigatus* (Gráfico 3). No entanto, após esse período, o meio AHF, seguido dos meios SDA, PDA e AIF, apresentam um crescimento mais rápido em relação ao meio BHIA, mas nenhum dos meios chega à capacidade de máxima crescimento da placa de Petri (Gráfico 5).

Realizou-se a análise da área total formada nas placas durante os 14 dias após o inóculo do fungo (Gráfico 6), que corrobora com os resultados presentes no gráfico 5. Reforçando que nenhum meio chegou à capacidade máxima da placa de Petri, mas evidenciou que os meios com melhores desenvolvimento foram o AHF e o meio SDA, sendo BHIA o que menos se desenvolveu (Gráfico 6). No entanto, diferente do *A.fumigatus* (Gráfico 4), a *Curvularia* sp. apresentou um menor rendimento no meio PDA (Gráfico 6).

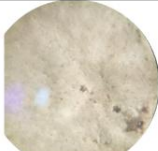
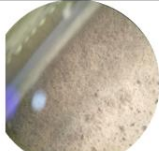
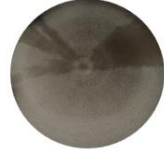
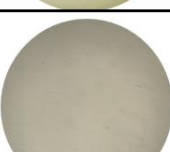
Gráfico 6 - Crescimento fúngico medido em área do *Curvularia* sp. ao longo de 14 dias



Fonte: Autoria própria.

O fungo no meio AHF indica ter um melhor desenvolvimento (Gráfico 5 e 6), mas uma análise da macroscopia das placas no 14º dia, principalmente no microscópio estereoscópio do centro e da borda das colônias, indica que o crescimento é principalmente micelial, com pouca produção de estruturas reprodutivas no centro da colônia. Além disso, demonstra que as características colônias diferem muito entre os meios (Tabela 11).

Tabela 11 - Macroscopia das culturas de *Curvularia* spp..

	MACROSCOPIA		ESTEREOSCÓPIO	
	ANVERSO DA PLACA DE PETRI	REVERSO DA PLACA DE PETRI	CENTRO DA COLÔNIA	BORDA DA COLÔNIA
PDA				
SDA				
BHIA				
AHF				
AIF				

Fonte: Autoria própria.

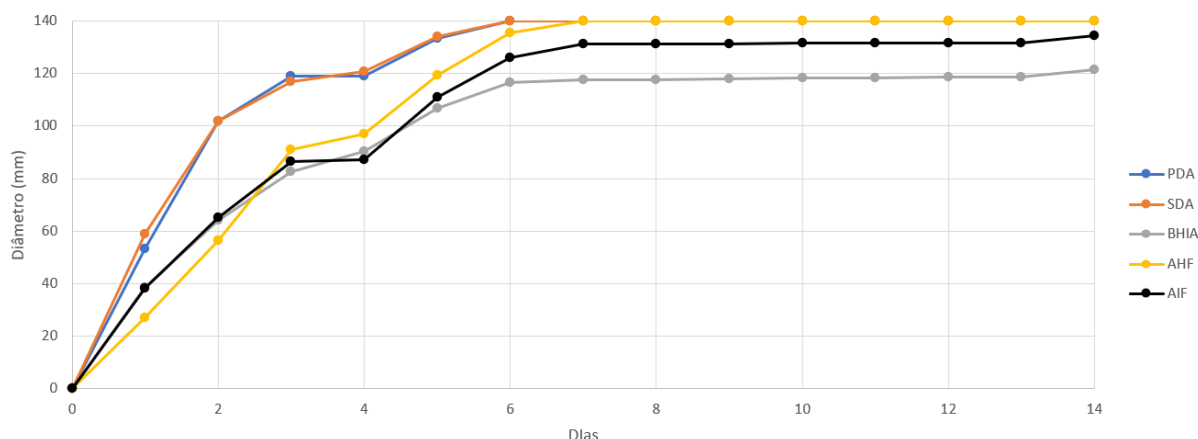
As colônias em PDA e SDA apresentam macromorfologias bastante parecidas, inclusive sendo bem uniformes na análise no microscópio estereoscópio do centro e da borda (Tabela 11). Apesar do crescimento em BHIA ser menor em relação ao crescimento em AIF (Gráfico 5 e 6), as colônias compartilham mais características em comum quando comparadas com os meios PDA, SDA e AHF (Tabela 11). Isso porque no centro das colônias há grande presença das estruturas fúngicas, diferente do que se é visualizado nas bordas das colônias.

6.5. A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de *Rhizopus* spp.

O *Rhizopus* sp. é um fungo da cenocítico que apresenta como característica um rápido desenvolvimento colonial, chegando à maturação até 72 dias (45,47).

Em relação ao desenvolvimento fúngico nos meios de cultura PDA, SDA, BHIA, AIF e AHF, diferente do que foi analisado em *A.fumigatus* (Gráficos 3 e 4) e *Curvularia* sp. (Gráficos 4 e 5), desde o primeiro dia houve um crescimento exponencial das colônias em todos os meios, que desacelerou já no 5º dia após o inóculo dos fungos, onde nos meios PDA e SDA chegou a capacidade máxima de crescimento da placa no 6º dia (gráfico 5).

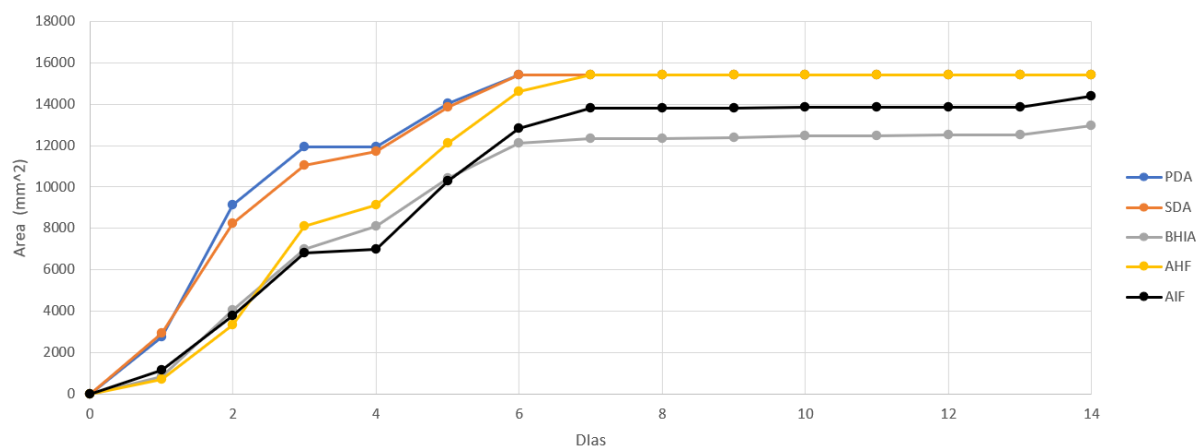
Gráfico 7 - Crescimento fúngico medido em diâmetro do *Rhizopus* sp. ao longo de 14 dias.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se que apesar do crescimento mais intenso comparado aos outros fungos analisados, o meio BHIA ainda é o que apresenta menor desenvolvimento quando comparado com os demais meios. Importante mencionar que os meios PDA e SDA apresentam características de desenvolvimento semelhantes, seguido do meio AHF que chega à capacidade máxima no 7º dia após o inóculo (Gráfico 7).

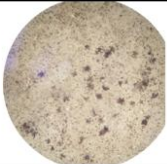
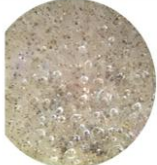
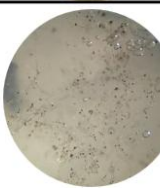
Em relação a análise da área total formada nas placas durante os 14 dias após o inóculo do fungo (Gráfico 8), não houve discordância com o gráfico anterior, apenas reforçou que os meios PDA e SDA apresentaram desenvolvimento similares e que o BHIA teve um pior rendimento.

Gráfico 8 - Crescimento fúngico medido em área do *Rhizopus* sp. ao longo de 14 dias.

Fonte: Autoria própria.

Diferente dos fungos anteriores, observou-se que o *Rhizopus* sp. em todos os meios que foi cultivado, quando analisado o reverso da placa, o micélio quase confluiu em todas as placas (Tabela 12). No entanto, ao analisar o anverso da placa, foi possível verificar que nos meios PDA e SDA houve confluência de toda da placa, diferente do crescimento nos meios BHIA, AIF e AHF. Sendo o meio AHF o que menos apresentou formação micelial, o que foi confirmado ao observar-se no microscópio estereoscópio a presença de poucas estruturas reprodutivas (Tabela 12).

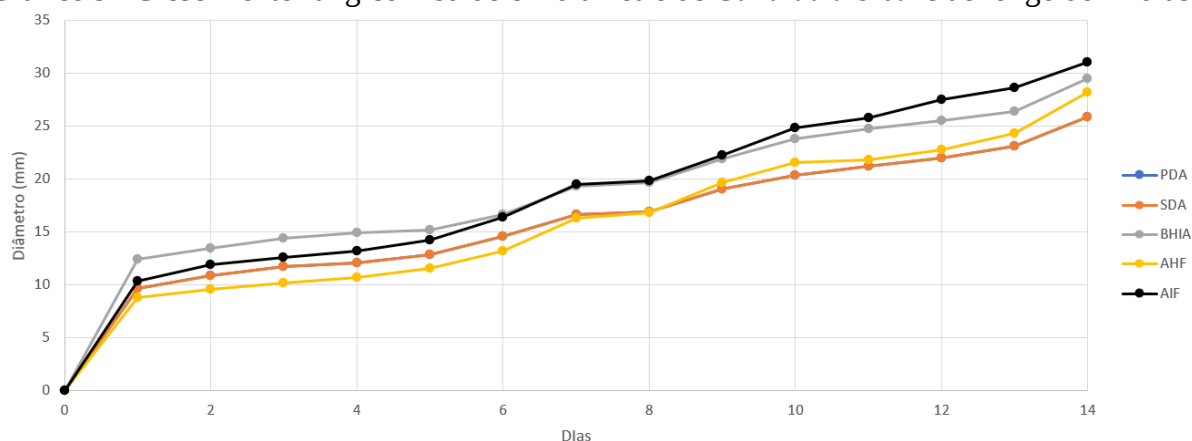
Tabela 12 - Macroscopia das culturas de *Rhizopus* spp..

	MACROSCOPIA		ESTEREOSCÓPIO	
	ANVERSO DA PLACA DE PETRI	REVERSO DA PLACA DE PETRI	CENTRO DA COLÔNIA	BORDA DA COLÔNIA
PDA				
SDA				
BHIA				
AHF				
AIF				

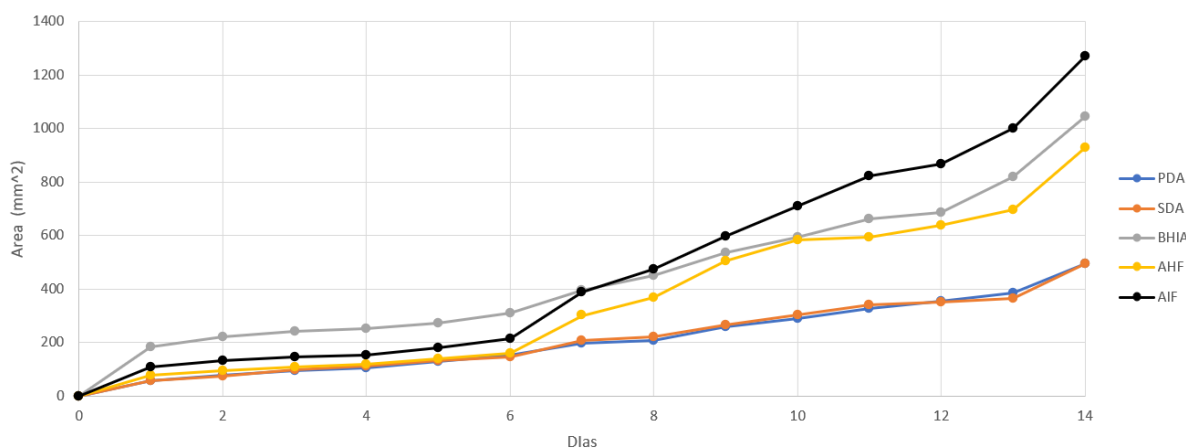
Fonte: Autoria própria.

6.6. A diferença de meios de cultura interfere no crescimento de *Candida albicans*

A *Candida albicans* é um fungo leveduriforme que em determinadas situações pode apresentar pseudohifas e hifas verdadeiras (89,93), que apresentou resultados contraditórios quando comparados com os fungos filamentosos *A.fumigatus*, *Curvularia* sp. e *Rhizopus* sp.. Uma vez que se observou que os fungos que mais se desenvolveram foram os cultivados nos meios AIF e BHIA, com os meios PDA e SDA apresentando os piores rendimentos (Gráficos 9 e 10).

Gráfico 9 - Crescimento fúngico medido em diâmetro do *Candida albicans* ao longo de 14 dias.

Fonte: Autoria própria.

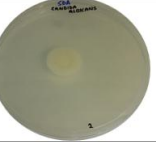
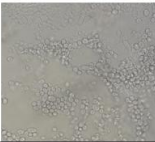
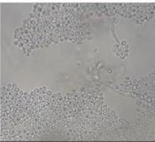
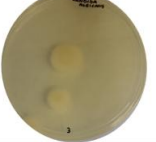
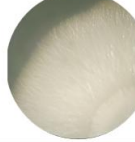
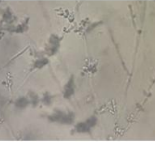
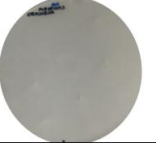
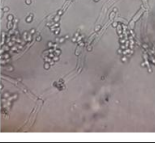
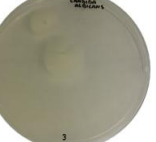
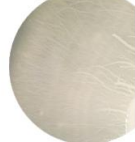
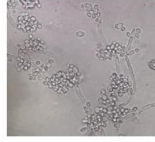
Gráfico 10 - Crescimento fúngico medido em área do *Candida albicans* ao longo de 14 dias.

Fonte: Autoria própria.

Uma observação importante é que mesmo havendo uma inversão dos meios em relação ao crescimento fúngico, observa-se que os meios PDA e SDA apresentam padrões de crescimento semelhantes. E, nesse caso, apesar do meio AHF não apresentar o melhor crescimento, ele está mais próximo do AIF e BHIA quando comparado com os meios PDA e SDA (Gráfico 10). Outra grande diferença em relação aos fungos filamentosos, é o fato de que em todos os meios de cultura houve um crescimento abrupto das colônias no primeiro dia após o inóculo e depois se manteve mais estável (Gráfico 9). Embora, ao analisar a área total, observa-se que a partir do sexto dia após o inóculo, as colônias nos meios AIF, BHIA e AHF começam se desenvolver mais comparado com os meios PDA e SDA, mas nenhuma colônia atinge a capacidade máxima da placa de Petri (Gráfico 10).

Um fato interessante é que ao analisar as colônias crescidas em SDA e PDA, além do crescimento fúngico ser semelhantes (Gráfico 10), as características morfológicas macroscópicas e microscópicas também se assemelham, sendo visualizado no microscópio leveduras e blastoconídios na borda da colônia (Tabela 13).

Tabela 13 - Macroscopia e microscopia das culturas de *Candida albicans*.

	MACROSCOPIA		ESTEREOSCÓPIO	MICROSCOPIA	
	ANVERSO DA PLACA DE PETRI	REVERSO DA PLACA DE PETRI	BORDA DA COLÔNIA	ANÁLISE DA LEVEDURA NO MEIO DE CULTURA	
PDA					
SDA					
BHIA					
AHF					
AIF					

Fonte: Autoria própria.

Diferente do que se observa nas colônias presentes nos meios BHIA, AIF e AHF, que no microscópio estereoscópio indicam apresentar processos de filamentação, que é confirmada ao analisar a microscopia da borda da colônia direto do meio de cultura, em que se observa estruturas de leveduras, blastoconídeos e pseudohifas (Tabela 13). Um fato interessante é que em todos os experimentos analisados, as bordas das colônias crescidas em BHIA apresentam pseudohifas, porém muitas leveduras e blastoconídeos. Já as crescidas em AIF e AHF, mesmo havendo leveduras presentes, há uma grande quantidade de filamentação (pseudohifas e hifas verdadeiras) (Tabela 13). Indicando que o meio realmente interfere nas características morfológicas das colônias fúngicas.

7. DISCUSSÃO

O primeiro trabalho publicado que destacou o uso do crescimento fúngico na determinação do IPM, realizado por van de Voorde e Van Dijck (79), considerou que a temperatura é um fator de interferência para o IPM. Sendo necessário para o desenvolvimento fúngico no laboratório, mimetizar a mesma temperatura aferida no local do crime a fim de conseguir estimar um IPM mais preciso.

Desde então trabalhos relataram a presença de outros fatores que podem influenciar na análise do IPM, como umidade e até mesmo condições *perimortem* (65,67,82). No entanto, não há pesquisas abordando a questão de os meios de culturas utilizados no laboratório, para mimetizar o desenvolvimento fúngico encontrado no cadáver humano, serem considerados provavelmente um interferente. Uma problemática que deveria ser abordada, visto que muitos trabalhos simplesmente não relatam quais meios foram utilizados na análise ou identificação dos fungos ou quando relatam, utilizam geralmente meios de rotina na micologia médica, como o SDA e o PDA (59,60,64,66).

A questão é que em outras áreas da micologia, é de conhecimento geral que determinados meios de cultura podem influenciar acelerando ou não o crescimento fúngico. Por exemplo, na micologia médica é comum utilizar o meio PDA na técnica de microcultivo, pois, por ser um meio pobre e a base de extrato vegetal, estimula a rápida esporulação fúngica, agilizando a identificação por meio da análise das estruturas reprodutivas dos fungos filamentosos (47). No entanto, na micologia forense a ideia é mimetizar as condições encontradas no cadáver, que fazendo uma analogia a um meio de cultura, seria um meio rico e a base proteica, diferente dos meios PDA e SDA que são os mais utilizados. Com isso, os isolados fúngicos crescidos no laboratório nesses meios podem não representar a mesma velocidade e padrão de crescimento dos fungos coletados no cadáver, o que pode levar a análises e conclusões equivocadas ou distorcidas acerca do tempo decorrido.

Comparando com os resultados deste trabalho, o meio de cultura poderia realmente influenciar na velocidade e padrão de crescimento fúngico, interferindo nas análises de estimativa de IPM. Isso porque, no geral, os meios SDA e PDA comportaram-se de maneira semelhante, tanto na velocidade do crescimento quando nas características morfológicas das colônias fúngicas, apresentando uma melhor amplificação das estruturas reprodutivas nos fungos filamentosos e um pior desempenho no desenvolvimento do fungo leveduriforme. No

entanto, os meios AIF, BHIA e AHF, que são a base de extratos proteicos, sendo na teoria os mais próximos do tecido cadavérico, mostraram resultados diferentes em relação aos meios PDA e SDA. Uma vez que nos meios AIF e BHIA o comportamento das colônias fúngicas foram semelhantes, pois nestes meios o crescimento das estruturas reprodutivas foi retardado nos fungos filamentosos e um melhor desempenho dos fungos leveduriformes. Além disso, observou-se no meio a presença de filamentação na borda das colônias leveduriformes nos meios BHIA, AHF e AIF, sendo a presença das pseudohifas mais intensas nos meios AHF e AIF, fato que não foi visualizado na borda das colônias isoladas nos meios PDA e SDA.

Outro fato que merece consideração é que os fungos filamentosos cultivados no meio AHF apresentaram um bom desempenho em relação ao crescimento micelial, chegando à capacidade máxima da área em todas as placas. No entanto, ao analisar as estruturas fúngicas presentes, nesse meio AHF, o desenvolvimento das estruturas reprodutivas é ainda mais lento quando comparado aos fungos crescidos no meio BHIA. Esses achados corroboram com a hipótese de que, na micologia forense, para uma análise mais precisa da estimativa do IPM do fungo coletado no cadáver, é preciso mimetizar as características do crescimento fúngico no laboratório, considerando como interferentes a temperatura, a umidade e o meio de cultura. Sendo o ideal utilizar meios micológicos com substratos análogos aos encontrados no tecido cadavérico, como os meios AHF e AIF produzidos neste trabalho. No entanto, é importante considerar que colônias fúngicas são encontradas não apenas nos cadáveres, mas em outros locais na cena do crime, como solo e plantas (56,59,64,70,107), e, nessa situação, os meios PDA e SDA seriam a melhor alternativa. Com isso, sugere-se como uma proposta inicial, que nos laboratórios voltados a micologia forense, a análise de estimativa de IPM por meio do crescimento das colônias fúngicas, seja realizada utilizando minimamente os meios PDA, SDA e BHIA, que já são comercializados, e, se possível, formular meios a partir de peças de açougue que sejam análogos ao órgão que o fungo cresceu.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo contribui para o campo da tecnologia forense demonstrando o panorama atual da aplicação de fungos no âmbito criminal e constata a necessidade nacional e internacional de um modelo eficaz e atuante para analisar os vestígios fúngicos presentes em cenas de crime. Diante deste cenário, é preciso que mais pesquisas em relação ao comportamento fúngico na área forense sejam incentivadas, visto que, na prática, são organismos sempre muito presentes em situações judiciais.

É de grande relevância a elaboração de um protocolo padrão para os procedimentos micológicos aplicados na área forense. Visto que a literatura científica tem apontado que é uma área com grande potencial, porém mesmo que o profissional conheça minimamente sobre o tema, na prática acaba recorrendo a procedimentos não padronizados, que podem levar a existência de vários fatores que contribuem para erros de análise.

Em relação aos meios de cultura, os fungos apresentaram velocidade de crescimento distintos nos diferentes meios utilizados, sendo visível um melhor crescimento micelial dos fungos nos meios de base proteica, enquanto o crescimento reprodutivo desenvolveu-se melhor nos meios de base vegetal. Com isso, um meio de cultura análogo ao tecido cadavérico poderá corroborar melhor com o real tempo de intervalo *post-mortem*, fortalecendo essa evidência forense. No entanto, os meios de base vegetal devem ser utilizados quando o fungo for coletado em outros locais na cena do crime, sendo necessário utilizar mais de um meio na análise da estimativa do IPM.

Assim, este estudo recomenda uma atenção especializada a elaboração de procedimentos laboratoriais em micologia forense. Com cada técnica sendo considerada a sua especificidade, principalmente os fatores de interferência que prejudicam a análise final do procedimento. Assim, espera-se aprimorar a qualidade das técnicas laboratoriais em relação a área forense, com foco em minimizar os erros e tendo como horizonte procedimentos laboratoriais que podem ser utilizados para a resolução de casos criminais.

REFERÊNCIAS

1. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueiras MJ. Atlas of Clinical Fungi. CBS-KNAW Biodiversity Centre, 2020.
2. Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Biodiversity Centre, 2019.
3. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. Springer, 2009.
4. Campbell CK, Johnson EM, Warnock DW. Identification of Pathogenic Fungi. Wiley-Blackwell, 2013.
5. Knoll AH. Life on a Young Planet. Princeton University Press, 2003.
6. Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science*, v. 320, n. 5879, p. 1034–1039, 2008.
7. Holland HD. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, v. 361, n. 1470, p. 903-915, 2006.
8. Schopf JW. Microfossils of the early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, v. 260, n. 5108, p. 640–646, 1993.
9. Buick, R. The Antiquity of Oxygenic Photosynthesis: Evidence from Stromatolites in the Archean era. *Science*, v. 255, n. 5040, p. 74–77, 1992.
10. Butterfield N J. Oxygen, animals and oceanic ventilation: an alternative view. *Geobiology*. v. 7, n. 1, p. 1–7, 2009.
11. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of
12. Berbee ML, James TY, Strullu-Derrien C. Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. *Annual Review of Microbiology*, v. 71, p. 41-60, 2017.
13. Tedersoo L, Brundrett MC. Evolution of Ectomycorrhizal Symbiosis in Plants. *New Phytologist*, v. 220, n. 4, p. 1047-1061, 2017.
14. Loron CC, François C, Rainbird RH, Turner EC, Borensztajn S, Javaux EJ. Early fungi from the Proterozoic era in Arctic Canada. *Nature*. V. 5720, n. 7760, p. 232-235, 2019.
15. Honegger R, Edwards D. Fungal remains in early Devonian terrestrial ecosystems. *Geology*. V. 41, n. 5, p. 535-538, 2013.
16. Taylor TN, Krings M, Taylor EL. Fossil Fungi. London: Academic Press; 2015.

17. Redecker D, Kodner R, Graham LE. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, v. 289, n. 5486, p. 1920-1921, 2000.
18. Baldrian P. Fungal laccases: occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. V. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.
19. Martiny JBH, Jones SE, Lennon JT, Martiny AC. Microbiomes in light of traits: A phylogenetic perspective. Vol. 350, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2015.
20. Deacon, JW. *Fungal Biology*, 4th ed. Blackwell Publishing, 2005.
21. Floudas D, Binder M, Riley R. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, v. 336, n. 6089, p. 1715-1719, 2012.
22. Allison SD, Wallenstein MD, Bradford MA. Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nature Geoscience*, v. 3, n. 5, p. 336-340, 2010.
23. Kirk, PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JÁ. *Dictionary of the fungi*. 10th ed. CAB International, 2008.
24. Gadd GM. *Fungi in Biogeochemical Cycles*. Cambridge University Press; 2006.
25. Cairney JWG. Ectomycorrhizal fungi and nitrogen cycling: implications for ecosystems. *Mycorrhiza*. V. 22, n. 7, p. 549-565, 2012.
26. Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. Academic Press; 2008.
27. Heijden MGA, Bardgett RD, Straalen NM. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*. V. 11, n. 3, p. 296-310, 2008.
28. Hibbett DS, Donoghue MJ. Analysis of Character Correlations Among Wood Decay Mechanisms, Mating Systems, and Substrate Ranges in Homobasidiomycetes. *Systematic Biology*, v. 50, n. 2, p. 215-242, 2001.
29. Webster J, Weber RWS. *Introduction to Fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, 2007.
30. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.
31. Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, *et al.* A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, v. 108, n.5, p. 1028-1046, 2016.
32. Tedersoo L, Sánchez-Ramírez S, Kõljalg U, Bahram M, Döring M, Schigel D, *et al.* High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*. V. 90, n. 1, p. 135-159, 2018.

33. Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Aoki T, Ariyawansa HA, *et al.* Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology*, v.6, n. 5, p. 540-548, 2021.
34. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, v. 73, n. 3, p. 203-266, 1998.
35. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. *Introductory Mycology*. 4th ed. Wiley; 1996.
36. Gow NAR, Gadd GM. *The Fungal Kingdom*. 2nd ed. American Society for Microbiology; 2023.
37. Nosanchuk, JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*, v. 5, n. 4, p. 203-223, 2003.
38. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.
39. Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 4, p. 884-928, 2010.
40. Taylor JW, Jacobson DJ, Fisher MC. TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; FISHER, M. C. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual review of phytopathology*, v. 37, n. 1, p. 197-246, 1999.
41. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.
42. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 2, p. 96-108, 2017.
43. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.
44. Sil A, Andrianopoulos A. Thermally dimorphic human fungal pathogens—polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 5, n. 8, p. a019794, 2015.
45. Neufeld PM. Micologia. In: Barcelos LF, Aquino JL, editores. *Tratado de Análises Clínicas*. 1º ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2018.
46. Kendrick B. *The fifth kingdom*. Hackett Publishing, 2017.
47. Procop Gary W, Church DL, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL, editores. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas*. 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2018.
48. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ Zygomycetes in human disease. *Clinical microbiology reviews*, v. 13, n. 2, p. 236-301, 2000.

49. Bennett RJ, Forche A, Berman J. Rapid mechanisms for generating genome diversity: whole ploidy shifts, aneuploidy, and loss of heterozygosity. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, n. 10, p. a019604, 2014.
50. Steciow MM, Lara E, Pillonel A, Pelizza AS, Lestani EA, Rossi GC *et al.* Incipient loss of flagella in the genus *Geolegnia*: the emergence of a new clade within *Leptolegnia*?. *IMA fungus*, v. 4, p. 169-175, 2013.
51. Pontecorvo G, Roper JA, Chemmons LM, Macdonald KD, Bufton AWJ. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*, v. 5, p. 141-238, 1953.
52. Berman J, Hadany L. Does stress induce (para) sex? Implications for *Candida albicans* evolution. *Trends in Genetics*, v. 28, n. 5, p. 197-203, 2012.
53. Wainwright M. An introduction to fungal biotechnology. Wiley; 1992.
54. Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. V. 95, n. 6, p. 641-655, 1991.
55. Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
56. Hawksworth DL, Wiltshire PEJ. Forensic mycology: The use of fungi in criminal investigations. Vol. 206, *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd; 2011. p. 1–11.
57. Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. Vol. 94, *Naturwissenschaften*. 2007. p. 12–24.
58. Singh M, Paul N, Singh S, Nayak GR. Asthma and fungus: role in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) and other conditions. *The Indian Journal of Pediatrics*, v. 85, p. 899-904, 2018.
59. Tranchida MC, Pelizza SA, Eliades LA. The use of fungi in forensic science, a brief overview. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, v. 54, n. 1, p. 35-48, 2021.
60. Hawksworth DL, Wiltshire P. Forensic mycology: current perspectives. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, p. 75-83, 2015.
61. Sidrim JJC, Moreira Filho RE, Cordeiro RA, Rocha MFG, Caetano EP, Monteiro AJ, *et al.* Fungal microbiota dynamics as a postmortem investigation tool: Focus on *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* species. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, n. 5, p. 1751-1756, 2010.
62. Martínez-Ramírez JA, Strien J, Sanft J, Mall G, Walther G, Peters FT. Studies on drug metabolism by fungi colonizing decomposing human cadavers. Part I: DNA sequence-based identification of fungi isolated from postmortem material. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 405, p. 8443-8450, 2013.
63. Fernández-Rodríguez A, Alberola J, Cohen MC. Análisis microbiológico *post mortem*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 31, n. 10, p. 685-691, 2013.
64. Illana-Esteban C. Micología forense. *Bol. Soc. Micol. Madrid*. 2013.

65. Rossi IA, Rodas PAB, Silva FI, Torres N, Gerometta RMR. Actualizaciones en la tafonomía y su relación con la micología forense: revisión bibliográfica. Facultad de Medicina, UNNE Libro de Artículos Científicos en Salud, p. 4-8, 2022.
66. Steffy Y. Study of Medico-Legal Techniques in Mycology Science as an Application Tool in Forensic Investigations. Med Mycol Open Access, v. 9, n. 1, 2023.
67. Kato H, Kanno S, Fukuta M, Yaguchi T, Aoki Y. Cadavers found outdoor in whom fungal growth was observed on the body surface: Consideration of the role of mycology in forensic medicine. Legal Medicine, v. 65, p. 102301, 2023.
68. Ramos C. Potencial forense de microvestígios biogeológicos em ecossistema costeiro do Brasil [Dissertação]. Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 2019.
69. Tranchida MC, Centeno ND, Cabello MN. Soil fungi: Their potential use as a forensic tool. Journal of Forensic Sciences, v. 59, n. 3, p. 785-789, 2014.
70. Wiltshire PEJ. Mycology in palaeoecology and forensic science. Fungal Biology, v. 120, n. 11, p. 1272-1290, 2016.
71. Hitosugi M, Ishii K, Yaguchi T, Chigusa Y, Kurosu A, Kido M, *et al.* Fungi can be a useful forensic tool. Legal Medicine, v. 8, n. 4, p. 240-242, 2006.
72. Goebel CS, Oliveira FM, Severo LC, Picanço JB, Alho CS. Análise micológica durante a decomposição cadavérica. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 12, n. 1, p. 28-32, 2013.
73. Senanayake IC, Rathnayaka AR, Marasinghe DS, Calabon MS, Gentekaki E, Lee HB, *et al.* Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. Mycosphere, v. 11, n. 1, p. 2678-2754, 2020.
74. Rodrigues TB. Avaliação da sucessão fúngica em carcaça de suíno (*Sus scrofa* L.) para a determinação de intervalo *post mortem*. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. 2014.
75. Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al.* PRISMA 2020 explanation and elaboration: Updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. The BMJ, v. 372, 2021.
76. Santos CMCS, Pimenta CAM, Nobre MRC. The PICO strategy for the reseatch question construction and evidence Search. Revista latino-americana de enfermagem, v. 15, p. 508-511, 2007.
77. Aromataris E, Fernandez R, Godfrey CM, Holly C, Khalil H, Tungpunkom P. Summarizing systematic reviews: Methodological development, conduct and reporting of an umbrella review approach. JBI Evidence Implementation, v. 13, n. 3, p. 132-140, 2015.
78. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al.* The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. The BMJ, v. 372, 2021.

79. Van De Voorde H, Dijck PJ Van. Determination of the Time of Death by Fungal Growth. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, v. 89, p. 75-80, 1982.
80. Filho REM, Sidrim JJC, Cordeiro RDA, Caetano EP, Rocha MFG, Brilhante RSN. *Trichophyton mentagrophytes* perforates hair of adult corpses in the gaseous period. *Journal of forensic sciences*, v. 55, n. 5, p. 1359-1361, 2010.
81. Beckett MC, Tucker S, Ozsoy AZ, Connor M. Identification of fungi found on desiccated human remains in an arid outdoor environment. *Journal of Forensic Sciences*, v. 67, n. 5, p. 2048-2054, 2022.
82. Di Piazza S, Zotti M, Barranco R, Cecchi G, Greco G, Ventura F. *Post-mortem* fungal colonization pattern during 6 weeks: Two case studies. *Forensic science international*, v. 289, p. e18-e23, 2018.
83. Dolinak D, Matshes E, Lew EO. *Forensic Pathology: Principles and Practice*. Elsevier, 2005.
84. Gemmellaro MD, Lorusso NS, Domke R, Kovalska KM, Hashim A, Arevalo Mojica M, *et al.* Assessment of Fungal Succession in Decomposing Swine Carcasses (*Sus scrofa* L.) Using DNA Metabarcoding. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 9, p. 866, 2023.
85. Lu Y, Su C, Liu H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 12, p. 707-714, 2014.
86. Grubb SEW, Murdoch C, Sudbery PE, Saville SP, Lopez-Ribot JL, Thornhill MH. *Candida albicans*-endothelial cell interactions: A key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 10, p. 4370-4377, 2008.
87. Lizarazo J. Diagnosis and Treatment of Fungal Infections. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 47, n. 184, p. 729-730, 2023.
88. Belozerskaya TA, Gessler NN, Aver'yanov AA. Melanin Pigments of Fungi. *Fungal Metabolites*. V. 8, p. 263-291, 2017.
89. Neufeld PM. *Manual de Micologia Médica: técnicas básicas de diagnóstico*. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, p. 30-133, 1999.
90. Paes RA, Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, n. 9, p. e3094, 2014.
91. Pasqualotto, AL. *Endemic Mycoses: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, 2024.
92. Brooks GF., Melnick JL., Adelberg EA., Jawetz Ernest. *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica*. McGraw-Hill Interamericana; 2011.
93. Reiss E, Shadomy HJ, Lyon G. *Fundamental medical mycology*. Wiley-Blackwell; 2012.

94. Tranchida MC, Berruezo LEB, Stenglein SA, Cabello MN. Mycobiota associated with human cadavers: First record in Argentina. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, v. 51, n. 2, p. 39-47, 2018.
95. César L. Métodos de conservação de alimentos: uso de calor. Tecnologia de produtos de origem animal. Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia Rural, Universidade Federal do Espírito Santo, 2008.
96. Vasconcelos MAS, Filho ABM. Conservação de alimentos. Recife: EDUFRPE, 2016.
97. III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: anais /Alexandre Alonso Alves, editor técnico. – Brasília, DF: Embrapa, 2016
98. Alexander bd. Reference method for broth dilution antifungalsusceptibility testing of filamentous fungi. M38. Clinical and laboratory standard institute (CLSI), 2017.
99. Rahimi M, Khameneh EA, Riazi-Esfahani H, Mahmoudi T, Khalili Pour E, Kafieh R. Application of ImageJ in Optical Coherence Tomography Angiography (OCT-A): A Literature Review. *Journal of Ophthalmology*, v. 2023, n. 1, p. 9479183, 2023.
100. Chandrasekar B, Milinis K, Lowe N, De S, Sharma SD. Assessment of tympanic membrane perforation size using ImageJ software by ENT clinicians of different grades. *Journal of Laryngology and Otology*, v. 138, n. 4, p. 388-390, 2024.
101. Schwarz P, Dannaoui E, Gehl A, Felske-Zech H, Birngruber CG, Dettmeyer RB, *et al.* Molecular identification of fungi found on decomposed human bodies in forensic autopsy cases. *International journal of legal medicine*, v. 129, p. 785-791, 2015.
102. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 6° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
103. Koneman EW. Koneman Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color. Ed. médica panamericana, 1997.
104. Leonardi JG, Azevedo BM. Métodos de conservação de alimentos. 2018.
105. Moreira C. Conservação dos Alimentos pelo Calor. *Revista de Ciência Elementar*, v. 3, n. 2, 2015.
106. Dix NJ, Webster J. Fungi of extreme environments. *Fungal ecology*, p. 322-340, 1995.
107. Tranchida MC, Centeno ND, Stenglein SA, Cabello MN. Primer registro de *Talaromyces udagawae* relacionado con cuerpos humanos en descomposición, en suelo de la Argentina. *Revista argentina de microbiología*, v. 48, n. 1, p. 86-90, 2016.

APÊNDICE – FICHA DE REGISTRO DE DADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA**1. Título do artigo**

2. Autores

3. Ano de Publicação

4. Periódico

5. Objetivos do estudo

6. População

7. Técnica aplicada

8. Fungos encontrados

9. Principais descobertas

10. Decisão dos revisores:

10.1. Artigo incluído? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

10.2. Artigo incluído pelo terceiro revisor? 1. Sim ☐ 2. Não ☐

ANEXO A - JBI CRITICAL APPRAISAL CHECKLIST FOR SYSTEMATIC REVIEWS AND RESEARCH SYNTHESSES ORIGINAL

	Yes	No	Not applicable
1. Were the inclusion criteria appropriate for the review question?	☐	☐	☐
2. Were the study subjects and the setting described in detail?	☐	☐	☐
3. Was the exposure measured in a valid and reliable way?	☐	☐	☐
4. Were objective, standard criteria used for measurement of the condition?	☐	☐	☐
5. Were confounding factors identified?	☐	☐	☐
6. Were strategies to deal with confounding factors stated?	☐	☐	☐
7. Were the outcomes measured in a valid and reliable way?	☐	☐	☐
8. Was appropriate statistical analysis used?	☐	☐	☐

Overall appraisal: Include ☐ Exclude ☐ Seek further info ☐

Comments (Including reason for exclusion): Articles were classified as to whether the risk of bias is "no", "yes" or "unclear" for each question present in the protocol, in all included articles. For each yes, a point was given, and articles scoring six or over were included in this review.

ANEXO B – LISTA DE VERIFICAÇÃO DE AVALIAÇÃO CRÍTICA DO JOANNA BRIGGS INSTITUTE (JBI) PARA REVISÕES SISTEMÁTICAS E SÍNTESES DE PESQUISAS ADAPTADO.

	Sim	Não	Não aplicável
1. Os critérios de inclusão na amostra foram claramente definidos?	☐	☐	☐
2. Os sujeitos do estudo e o ambiente foram descritos detalhadamente?	☐	☐	☐
3. A exposição foi medida de forma válida e confiável?	☐	☐	☐
4. Foram utilizados critérios objetivos e padronizados para medição da condição?	☐	☐	☐
5. Foram identificados fatores de confusão?	☐	☐	☐
6. Foram declaradas estratégias para lidar com fatores de confusão?	☐	☐	☐
7. Os resultados foram medidos de forma válida e confiável?	☐	☐	☐
8. Foi utilizada análise estatística adequada?	☐	☐	☐

Avaliação geral: Incluído ☐ Excluído ☐ Buscar mais informações ☐

Comentários (Incluído motivo de exclusão): Os artigos foram classificados quanto ao risco de viés ser “não”, “sim” ou “não claro” para cada questão presente no protocolo, em todos os artigos incluídos. Para cada sim, foi atribuído um ponto, e os artigos com pontuação igual ou superior a seis foram incluídos nesta revisão.