



BACHARELADO EM BIOMEDICINA

**LUCAS EMANUEL RYAN FAGUNDES BENTO**

**NECROBIOMA: A APLICAÇÃO DA MICROBIOLOGIA FORENSE**

Apucarana

2025

LUCAS EMANUEL RYAN FAGUNDES BENTO

**NECROBIOMA: A APLICAÇÃO DA MICROBIOLOGIA  
FORENSE**

Trabalho de conclusão apresentado  
ao Curso de Bacharelado em  
Biomedicina da Faculdade de  
Apucarana – FAP, como requisito  
parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Esp. Andréa  
Sabag Duarte

Lucas Emanuel Ryan Fagundes Bento

## **NECROBIOMA: A APLICAÇÃO DA MICROBIOLOGIA FORENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biomedicina da Faculdade de Apucarana - FAP, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, com nota final igual a \_\_\_\_\_, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profª. Esp. Andréa Sabag Duarte  
Faculdade de Apucarana

---

Prof. Drª. Ana Paula do Amaral Monaco  
Foganholi  
Faculdade de Apucarana

---

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas  
Faculdade de Apucarana

Apucarana, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2025.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer a todos que me acompanharam nesses anos de faculdade a minha família, amigos, professores e minha orientadora que me ajudou muito neste trabalho, muitas felicidades e gratidão por esse tempo em busca sempre de novas conquistas.

## SUMÁRIO

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>                                    | <b>8</b>  |
| 1.1 Introdução .....                                                    | 8         |
| 1.2 Introdução ao microbioma e sua importância na ciência forense ..... | 9         |
| 1.2.1 Definição e composição do microbioma .....                        | 9         |
| 1.2.2 O Papel do microbioma na decomposição humana .....                | 11        |
| 1.3 Tanatomiologia: a ciência do necrobioma .....                       | 14        |
| 1.3.1. Processos de decomposição cadavérica .....                       | 14        |
| 1.3.2 A dinâmica do necrobioma na decomposição .....                    | 15        |
| 1.4 Metodologias de análise do necrobioma .....                         | 17        |
| 1.4.1. Técnicas de biologia molecular .....                             | 17        |
| 1.4.2. Análise de dados e bioinformática .....                          | 21        |
| 1.4.3. Desafios e limitações das metodologias .....                     | 24        |
| REFERÊNCIAS .....                                                       | 27        |
| <b>2 ARTIGO .....</b>                                                   | <b>32</b> |
| INTRODUÇÃO .....                                                        | 33        |
| METODOLOGIA .....                                                       | 34        |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                            | 35        |
| CONCLUSÃO .....                                                         | 40        |
| REFERÊNCIAS .....                                                       | 41        |
| <b>3 ANEXO A - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – REVISTA F@P CIÊNCIA... 43</b>   |           |

BENTO, Lucas Emanuel Ryan Fagundes. **NECROBIOMA: A APLICAÇÃO DA MICROBIOLOGIA FORENSE**. 44 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo). Graduação em Biomedicina. Faculdade de Apucarana – FAP. Apucarana-PR. 2025.

## **RESUMO**

Diante das limitações dos métodos clássicos para estimar o Intervalo Pós-Morte (IPM), a microbiologia forense oferece uma abordagem inovadora através da tanatomiologia: o estudo do necrobioma. Este trabalho objetiva fornecer uma base teórica robusta sobre o tema, utilizando como metodologia uma revisão narrativa da literatura. A análise abrange a definição do microbioma e sua transformação no necrobioma após a morte, detalhando o papel dos microrganismos no processo de decomposição cadavérica. São apresentadas as principais metodologias de análise, com ênfase nas técnicas de biologia molecular, como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), e nas abordagens de bioinformática para o tratamento dos dados. Adicionalmente, são discutidos os principais desafios da área, como a influência de variáveis ambientais e a necessidade de padronização. Conclui-se que o entendimento aprofundado destes conceitos e técnicas é um alicerce indispensável para a correta interpretação e futuro avanço da aplicação do necrobioma em investigações periciais.

**Palavras-chave:** Microbiologia Forense. Necrobioma. Tanatomiologia. Intervalo Pós-Morte.

BENTO, Lucas Emanuel Ryan Fagundes. **NECROBIOME: THE APPLICATION OF FORENSIC MICROBIOLOGY**. 44 p. Course Completion Work (Article). Bachelor's Degree in Biomedicine. Faculty of Apucarana - FAP. Apucarana-PR. 2025.

## **ABSTRACT**

Given the limitations of classical methods for estimating the Post-Mortem Interval (PMI), forensic microbiology offers an innovative approach through thanatobiology: the study of the necrobiome. This work aims to provide a robust theoretical foundation on the subject, using a narrative literature review as its methodology. The analysis covers the definition of the microbiome and its transformation into the necrobiome after death, detailing the role of microorganisms in the cadaveric decomposition process. The main analysis methodologies are presented, with an emphasis on molecular biology techniques, such as Next-Generation Sequencing (NGS), and on bioinformatics approaches for data processing. Additionally, the main challenges in the field are discussed, such as the influence of environmental variables and the need for standardization. It is concluded that a deep understanding of these concepts and techniques is an indispensable foundation for the correct interpretation and future advancement of the application of the necrobiome in forensic investigations.

**Keywords:** Forensic Microbiology. Necrobiome. Thanatobiology. Post-Mortem Interval.

## 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1 Introdução

A estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) é um dos desafios centrais da ciência forense, fornecendo informações cruciais para a reconstrução de eventos e a elucidação de crimes. Os métodos tanatológicos clássicos, como a análise da rigidez cadavérica (*rigor mortis*) e da temperatura corporal (*algor mortis*), embora fundamentais, possuem uma janela de utilidade restrita e perdem precisão em cenários de grande variação ambiental ou em estágios avançados de decomposição (Pechal *et al.*, 2014).

Neste cenário de busca por novos marcadores, a microbiologia forense surge como uma fronteira promissora. O corpo humano abriga uma vasta e complexa comunidade de microrganismos, o microbioma, que desempenha funções vitais durante a vida e continua a mediar processos bioquímicos após a morte do hospedeiro (Javan *et al.*, 2016).

Com a cessação da homeostase, essa comunidade microbiana se transforma no necrobioma, dando origem a uma subdisciplina emergente e de grande potencial: a tanatomiobiologia, focada no estudo dos microrganismos envolvidos na decomposição cadavérica (Metcalf *et al.*, 2016).

A relevância da tanatomiobiologia reside no seu potencial de funcionar como um "relógio microbiano". Pesquisas recentes demonstram que a composição do necrobioma muda de maneira padronizada e temporalmente previsível, seguindo uma sucessão ecológica que pode ser monitorada e quantificada. Essa previsibilidade oferece a base para desenvolver métodos mais consistentes de estimativa de IPM, especialmente em casos complexos onde os métodos tradicionais falham. (Metcalf *et al.*, 2016).

Contudo, a aplicação prática desta abordagem não é frequente. A área enfrenta desafios significativos, como a influência de variáveis ambientais, a imensa diversidade microbiana entre indivíduos e a necessidade de padronização das metodologias de amostragem e análise. A transição de estudos em modelos animais para a aplicação em casos forenses reais exige,

portanto, um profundo entendimento dos seus fundamentos teóricos e metodológicos (Pechal *et al.*, 2014; Javan *et al.*, 2016).

Diante da relevância e complexidade do tema, a presente fundamentação teórica tem como objetivo fornecer uma revisão abrangente e estruturada sobre a aplicação da microbiologia forense, com ênfase no necrobioma como ferramenta para a estimativa do IPM. Por meio de uma revisão narrativa da literatura, este capítulo irá delinear os conceitos essenciais que sustentam a área. Primeiramente, será introduzido o conceito de microbioma e seu papel fundamental na decomposição. Em seguida, aprofundaremos na tanatomiologia, detalhando a dinâmica do necrobioma ao longo das fases da decomposição cadavérica. Por fim, serão discutidas as principais metodologias de análise, desde as técnicas de biologia molecular até a bioinformática, abordando também seus desafios e limitações. Esta base conceitual fornecerá o alicerce teórico necessário para a compreensão do artigo apresentado subsequentemente.

## **1.2 Introdução ao microbioma e sua importância na ciência forense**

### **1.2.1 Definição e composição do microbioma**

O termo microbioma refere-se ao conjunto completo do material genético de todos os microrganismos (bactérias, vírus, fungos, arqueias e protozoários) que habitam um determinado ambiente, além de englobar suas interações metabólicas e ecológicas com o hospedeiro (Marchesi; Ravel, 2015). Em contrapartida, o termo microbiota designa apenas a comunidade de microrganismos vivos que colonizam um ambiente específico, como o intestino, a pele ou a cavidade oral (Berg *et al.*, 2020).

Embora muitas vezes utilizados como sinônimos, microbiota e microbioma possuem significados distintos: a microbiota corresponde aos microrganismos propriamente ditos, enquanto o microbioma compreende esses organismos juntamente com seus genomas, produtos metabólicos e relações ecológicas (Ursell *et al.*, 2012).

O microbioma humano é composto por uma ampla diversidade de microrganismos que colonizam diferentes regiões do corpo, como pele, cavidade

oral, trato gastrointestinal, trato urogenital e sistema respiratório (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Os principais grupos microbianos que integram esse ecossistema são as bactérias, fungos, vírus, arqueias e protozoários, os quais coexistem em complexas redes de interação com o hospedeiro (Damann *et al.*, 2015).

As bactérias representam o grupo mais numeroso e bem caracterizado do microbioma humano, desempenhando papéis fundamentais na digestão de nutrientes, modulação do sistema imunológico, síntese de vitaminas e proteção contra patógenos (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Entre os filos bacterianos predominantes no intestino humano destacam-se *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (Qin *et al.*, 2010).

Os fungos, também denominados microbiota, embora em menor abundância, possuem relevância clínica e imunológica. Gêneros como *Candida*, *Malassezia* e *Saccharomyces* são frequentemente encontrados em diversas mucosas e na pele, podendo atuar como comensais ou oportunistas dependendo do equilíbrio da microbiota e do estado imunológico do hospedeiro (Underhill; Iliev, 2014).

Os vírus que habitam o corpo humano, coletivamente chamados de viroma, incluem principalmente bacteriófagos (vírus que infectam bactérias), além de vírus que infectam células humanas. Os bacteriófagos regulam a composição bacteriana e podem influenciar processos inflamatórios e imunomodulatórios (Norman *et al.*, 2015).

As arqueias, embora menos estudadas, têm sido identificadas principalmente no intestino humano, sendo *Methanobrevibacter smithii* a espécie arqueana mais comum. Elas participam do metabolismo de hidrogênio e metano e influenciam a digestão e o balanço energético do hospedeiro (Samuel *et al.*, 2007).

Por fim, os protozoários comensais, como *Blastocystis hominis*., também fazem parte do microbioma intestinal e sua presença pode estar associada tanto à saúde quanto à disbiose, dependendo do contexto ecológico e imunológico (Scanlan; Marchesi, 2008).

A diversidade e a variabilidade do microbioma humano são características fundamentais para a compreensão de sua dinâmica ecológica e impacto na saúde. Essa variabilidade ocorre tanto entre diferentes indivíduos

(interindividual) quanto entre diferentes nichos anatômicos de um mesmo hospedeiro (intraindividual), sendo influenciada por múltiplos fatores ambientais, genéticos e comportamentais (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Cada região do corpo humano possui condições físico-químicas específicas como pH, oxigenação, umidade e disponibilidade de nutrientes que moldam nichos microbianos distintos (Costello *et al.*, 2009).

Por exemplo, a microbiota da pele é dominada por bactérias dos gêneros *Staphylococcus.spp* e *Corynebacterium.spp*, enquanto o intestino é predominantemente colonizado por membros dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (Huttenhower *et al.*, 2012).

Além da variabilidade anatômica, o microbioma humano é altamente individualizado, sendo moldado por fatores como modo de parto, alimentação (particularmente na infância), uso de antibióticos, idade, sexo, estado imunológico, ambiente e estilo de vida. A composição microbiana de cada pessoa tende a ser relativamente estável ao longo do tempo, embora possa sofrer alterações transitórias ou permanentes diante de mudanças ambientais ou disfunções fisiológicas (Yatsunenko *et al.*, 2012).

Estudos metagenômicos demonstram que, embora indivíduos saudáveis compartilhem uma estrutura funcional conservada (conjunto de funções metabólicas básicas), há grande variação taxonômica entre os microbiomas individuais, o que reforça o conceito de "funcionalidade redundante" dentro da ecologia microbiana humana (Turnbaugh *et al.*, 2009).

### 1.2.2 O Papel do microbioma na decomposição humana

O microbioma humano exerce funções vitais para a manutenção da homeostase e da saúde do hospedeiro. Longe de ser apenas uma comunidade passiva de microrganismos, ele atua como um órgão metabólico e imunológico funcional, interagindo ativamente com sistemas fisiológicos, como o digestivo, o imune, o endócrino e até mesmo o sistema nervoso central (Belkaid; Hand, 2014).

No trato gastrointestinal, o microbioma participa da digestão de polissacarídeos complexos, da síntese de vitaminas (como vitamina K, B12, ácido fólico e biotina) e da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC),

como butirato, acetato e propionato, que fornecem energia ao epitélio intestinal e regulam inflamações locais e sistêmicas (Flint *et al.*, 2012).

Além disso, o microbioma desempenha um papel fundamental na modulação do sistema imunológico, promovendo a maturação das células imunes e a tolerância imunológica a antígenos não patogênicos. Ele atua como uma barreira contra microrganismos patogênicos, competindo por nutrientes e sítios de adesão nas mucosas, além de produzir substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas e ácidos orgânicos (Round; Mazmanian, 2009).

Estudos também revelam que o microbioma influencia o desenvolvimento neurológico e comportamental, por meio do chamado eixo microbiota-intestino-cérebro, uma via bidirecional que envolve sinalização neuroimune, hormonal e neuronal (Cryan; Dinan, 2012).

A disbiose, ou seja, o desequilíbrio na composição e função do microbioma tem sido associada a diversas condições clínicas, incluindo obesidade, diabetes tipo 2, doenças inflamatórias intestinais, asma, depressão, entre outras. Isso evidencia que a composição e estabilidade do microbioma são essenciais para a saúde humana (Lynch; Pedersen, 2016).

O processo de decomposição cadavérica envolve transformações físicas, químicas e biológicas que ocorrem após a morte, e cada um de seus estágios é acompanhado por alterações distintas na composição e atividade do microbioma, conhecido nesse contexto como necrobioma (Metcalf *et al.*, 2013).

A dinâmica microbiana pós-morte segue padrões sucessivos relativamente previsíveis, o que tem despertado interesse crescente na sua aplicação forense, especialmente na estimativa do intervalo post-mortem (IPM) (Metcalf *et al.*, 2016).

No estágio fresco (0 a 3 dias após a morte), a composição microbiana ainda se assemelha ao microbioma do indivíduo em vida, sendo dominada por microrganismos endógenos, especialmente os habitantes do trato gastrointestinal. Com o colapso das barreiras imunológicas e anatômicas, há uma translocação microbiana a partir do intestino para os tecidos estéreis, iniciando a colonização de órgãos internos como fígado, baço e coração, predominantemente por bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium.spp* (Javan *et al.*, 2016).

À medida que a decomposição avança para o estágio de putrefação (2 a 10 dias post-mortem), intensifica-se a atividade de microrganismos anaeróbios, que degradam compostos orgânicos como proteínas e carboidratos, gerando gases (metano,  $H_2S$ , amônia) e compostos orgânicos voláteis. Nesse estágio ocorre o aumento de bactérias fermentativas, como *Clostridium.spp*, *Bacteroides.spp* e *Fusobacterium.spp*, além do surgimento de viroses associadas à atividade de bacteriófagos (Hyde *et al.*, 2013).

No estágio de decomposição ativa (10 a 20 dias), há intensa degradação dos tecidos moles e liberação de fluidos orgânicos, favorecendo uma alta proliferação e diversidade bacteriana (Pechal *et al.*, 2014).

A comunidade microbiana passa a incorporar microrganismos exógenos provenientes do solo e de vetores necrófagos. Bactérias dos gêneros *Proteus.spp*, *Pseudomonas.spp* e *Enterococcus.spp* tornam-se predominantes, refletindo um ambiente cada vez mais anóxico e rico em nutrientes de origem cadavérica (Pechal *et al.*, 2014).

Com o avanço para o estágio de decomposição avançada (após 3 a 4 semanas), grande parte dos tecidos moles já foi consumida, e o necrobioma apresenta redução na diversidade, sendo dominado por microrganismos ambientais. Fungos saprófitas e actinobactérias, como *Streptomyces.spp*, passam a atuar na degradação de materiais mais resistentes, como colágeno e queratina. Nessa fase, as funções metabólicas bacterianas mudam de um perfil putrefativo para saprofítico (Metcalf *et al.*, 2016).

Finalmente, no estágio de esqueletização, que pode durar semanas ou meses, o necrobioma é composto quase exclusivamente por microrganismos do ambiente, com pouca ou nenhuma influência do microbioma original do hospedeiro. Bactérias do solo como *Bacillus.spp* e fungos decompositores predominam, e a atividade microbiana passa a refletir majoritariamente as condições ecológicas locais do ambiente de decomposição (Damann *et al.*, 2015).

Essas alterações sucessivas no microbioma cadavérico não apenas desempenham papel essencial na degradação da matéria orgânica, mas também representam uma ferramenta emergente na ciência forense, com potencial para estimar o tempo de morte com maior precisão por meio da análise metagenômica das comunidades microbianas (Strete, *et al.*, 2025).

### 1.3 Tanatomiologia: a ciência do necrobioma

#### 1.3.1. Processos de decomposição cadavérica

A decomposição cadavérica é um processo biológico dinâmico, influenciado por fatores intrínsecos (como idade, causa da morte e microbioma) e extrínsecos (como temperatura, umidade, oxigenação e presença de insetos) (Goff, 2009). Esse processo é comumente dividido em estágios sucessivos, cada um caracterizado por eventos físico-químicos e microbiológicos distintos. As principais fases incluem: autólise, putrefação, fermentação butírica, mumificação e esqueletização (Goff, 2009).

A autólise, ou autodigestão, representa o primeiro estágio da decomposição e ocorre imediatamente após a morte. Trata-se da degradação das células por enzimas lisossômicas que escapam de suas organelas devido à falência das barreiras celulares (Madea, 2016). A ausência de oxigênio (hipóxia) leva ao acúmulo de ácido láctico, alterando o pH intracelular e promovendo a desnaturação de proteínas e degradação de organelas (Madea, 2016). Esse estágio é estéril e não envolve ação bacteriana externa, sendo o ponto de partida para os eventos subsequentes (Metcalf *et al.*, 2013).

A putrefação é o estágio mais evidente e ativo da decomposição, caracterizado pela ação de bactérias anaeróbias e facultativas, majoritariamente provenientes do intestino, como *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. e *Escherichia coli*. Esses microrganismos degradam proteínas e carboidratos, liberando gases (como H<sub>2</sub>S, metano e amônia), ácidos orgânicos e pigmentos como a sulfemoglobina, que causa a coloração verde da pele (Metcalf *et al.*, 2013).

É neste estágio que se observa distensão abdominal, formação de bolhas, coloração escura da pele e odor fétido, sendo fortemente influenciado pela temperatura ambiental (Carter *et al.*, 2007).

Nesta fase, há predomínio de bactérias do gênero *Clostridium butyricum*, que fermentam restos orgânicos resistentes. Os tecidos tornam-se secos, esponjosos e emitem um odor rançoso típico de ácido butírico. Esse estágio pode ocorrer em condições de baixo oxigênio e umidade moderada, e representa uma transição entre a decomposição ativa e a mumificação ou esqueletização (Goff, 2009).

A mumificação ocorre quando o corpo perde água rapidamente, inibindo a proliferação microbiana. Isso acontece em ambientes quentes, secos e ventilados, levando à desidratação dos tecidos moles, que adquirem aspecto coriáceo e coloração marrom-escura. O corpo pode manter-se preservado por anos, com pouca ou nenhuma atividade microbiana ativa (Madea, 2016).

A esqueletização marca o estágio final da decomposição, caracterizado pela remoção completa dos tecidos moles. Pode ser resultado da ação combinada de microrganismos, insetos necrófagos, vertebrados carniceiros e fatores ambientais. A taxa de esqueletização varia amplamente, podendo levar de semanas a anos, dependendo das condições climáticas e da exposição do corpo (Pechal *et al.*, 2014).

### 1.3.2 A dinâmica do necrobioma na decomposição

As mudanças na composição e na abundância dos microrganismos que compõem o necrobioma ao longo do tempo são determinadas por fatores como a fase de decomposição, a origem anatômica das comunidades microbianas, o ambiente em que o corpo se encontra, e o tempo decorrido desde a morte (Metcalf *et al.*, 2013).

A sucessão microbiana pós-morte é um processo dinâmico e relativamente previsível, sendo alvo de crescente interesse na microbiologia forense, sobretudo para estimativas do intervalo post-mortem (IPM) e para a compreensão das interações entre hospedeiro e ambiente após a morte (Metcalf *et al.*, 2013; Pechal *et al.*, 2014).

Nas primeiras horas após o óbito, predominam microrganismos endógenos, principalmente aqueles que colonizam o intestino e as mucosas, como membros das famílias Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae e Clostridiaceae. Com a falência do sistema imunológico e a ausência de barreiras epiteliais funcionais, esses microrganismos translocam-se para tecidos estéreis, como fígado, pulmões e coração, iniciando a colonização cadavérica interna. Esse processo marca o início da transição do microbioma do hospedeiro vivo para o necrobioma (Hyde *et al.*, 2013).

À medida que a autólise e a putrefação avançam, ocorre um aumento da atividade de bactérias anaeróbias e fermentativas, como *Clostridium* spp., que

se tornam dominantes durante os estágios de putrefação ativa. Essas bactérias promovem a degradação de proteínas, lipídios e carboidratos, resultando na liberação de gases e compostos voláteis, como aminas, ácidos graxos, e enxofre reduzido, que alteram significativamente o microambiente cadavérico (Carter *et al.*, 2007).

Durante esse estágio, observa-se uma diminuição da diversidade microbiana global, com predominância de grupos adaptados a ambientes anóxicos e ricos em matéria orgânica em decomposição (Carter *et al.*, 2007).

Com a progressão para os estágios avançados de decomposição (putrefação tardia e esqueletização), ocorre uma nova reorganização da comunidade microbiana. O necrobioma passa a incluir microrganismos exógenos provenientes do solo, insetos necrófagos e do ambiente externo (Cobaugh *et al.*, 2015).

Nessa fase, bactérias ambientais como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Actinobacteria* tornam-se mais frequentes, enquanto a dominância de anaeróbios intestinais diminui. Além disso, a abundância relativa de leveduras e fungos, como *Candida* e *Aspergillus*., pode aumentar, especialmente em condições de umidade, contribuindo para a degradação residual de tecidos e ossos (Cobaugh *et al.*, 2015).

Estudos recentes com sequenciamento de nova geração (NGS) têm revelado que a sucessão microbiana segue um padrão temporal relativamente constante, com mudanças previsíveis na estrutura da comunidade microbiana em função do tempo desde a morte (Metcalf *et al.*, 2013).

Esse fenômeno é conhecido como "relógio microbiano" (microbial clock) e tem demonstrado correlações significativas entre perfis microbianos e o tempo post-mortem em modelos experimentais (Metcalf *et al.*, 2013; Hauther *et al.*, 2015). Essa característica reforça o potencial do necrobioma como ferramenta complementar na estimativa do IPM em investigações forenses (Metcalf *et al.*, 2013).

Em suma, as alterações na composição e na abundância dos microrganismos do necrobioma ao longo do tempo refletem uma sucessão ecológica complexa, influenciada por fatores fisiológicos e ambientais, que transformam gradualmente o microbioma vivo em uma comunidade

necrobiológica diversa, adaptada à decomposição cadavérica (Round; Mazmanian, 2009).

## **1.4 Metodologias de análise do necrobioma**

### **1.4.1. Técnicas de biologia molecular**

A análise do necrobioma - o conjunto de microrganismos que colonizam um cadáver após a morte - depende diretamente da extração eficiente de ácidos nucleicos, principalmente DNA e RNA, a partir de amostras ambientais ou biológicas altamente degradadas (Lauber *et al.*, 2010). A qualidade e a integridade do material genético extraído são fatores determinantes para o sucesso das análises moleculares subsequentes, como o sequenciamento de nova geração (NGS), PCR em tempo real e metatranscriptômica (Metcalf *et al.*, 2016).

Para a extração de DNA do necrobioma, técnicas baseadas em kits comerciais são amplamente utilizadas devido à sua padronização, reprodutibilidade e capacidade de remover inibidores comuns em amostras cadavéricas (Metcalf *et al.*, 2016).

Os kits baseados na extração por colunas de sílica, como o DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN) ou ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research), são especialmente eficazes para amostras provenientes de solo, fezes, biofilmes e tecidos em decomposição (Metcalf *et al.*, 2016). Essas metodologias envolvem uma etapa inicial de lise mecânica, geralmente realizada por bead-beating, seguida por lise química com detergentes e reagentes de desnaturação, e posterior purificação por ligação seletiva do DNA à coluna de sílica (Lauber *et al.*, 2010).

Já para a extração de RNA, utilizada principalmente em estudos de metatranscriptômica para avaliar a atividade metabólica microbiana em diferentes estágios da decomposição, é necessário um cuidado adicional para evitar a degradação do RNA por RNases. Kits como o RNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN) ou ZymoBIOMICS RNA Miniprep Kit são recomendados (Javan *et al.*, 2019).

O protocolo envolve a estabilização imediata das amostras (frequentemente com agentes como RNAlater), lise celular sob condições que inativam RNases, e purificação em condições de baixa temperatura. A integridade do RNA extraído é avaliada por eletroforese em gel ou por bioanalisadores como o Agilent Bioanalyzer, que fornecem o RNA Integrity Number (RIN) (Flint *et al.*, 2012).

Em muitos casos, protocolos combinados de extração de DNA/RNA são adotados para permitir análises integradas (metagenômica e metatranscriptômica) a partir de uma mesma amostra, o que amplia a compreensão sobre a composição e a função das comunidades microbianas ao longo do processo de decomposição (Javan *et al.*, 2019).

Além disso, a extração eficiente de DNA e RNA a partir de diferentes substratos como solo, tecidos moles, ossos e fluidos corporais requer adaptações metodológicas específicas para cada tipo de amostra, especialmente na etapa de pré-processamento e remoção de inibidores (Lauber *et al.*, 2010).

A padronização dos protocolos de extração de ácidos nucleicos tem sido apontada como um passo fundamental para o avanço da microbiologia forense, uma vez que variações na eficiência da extração podem impactar significativamente os perfis microbianos obtidos e, consequentemente, as interpretações forenses, como a estimativa do intervalo post-mortem (IPM) (Metcalf *et al.*, 2016).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de biologia molecular desenvolvida por Kary Mullis em 1983, cuja principal função é a amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA *in vitro*. Esse método revolucionou as ciências biomédicas e forenses por permitir a detecção e identificação de microrganismos a partir de quantidades mínimas de material genético, com alta sensibilidade e especificidade (Mullis; Faloona, 1987).

A PCR baseia-se na utilização de três etapas cíclicas principais: desnaturação, anelamento e extensão. Na etapa de desnaturação, a amostra é aquecida (geralmente a 94--95 °C) para separar as duas fitas da molécula de DNA. Em seguida, na etapa de anelamento (50--65 °C), são adicionados primers

oligonucleotídeos específicos que se ligam às extremidades do fragmento-alvo (Saiki *et al.*, 1988).

Por fim, na etapa de extensão (geralmente a 72 °C), a DNA polimerase (geralmente a Taq polimerase, termoestável) sintetiza uma nova fita complementar de DNA. Esses ciclos são repetidos por 25 a 40 vezes, resultando na amplificação exponencial do fragmento de interesse (Saiki *et al.*, 1988).

Na identificação de microrganismos, a PCR pode ser aplicada de forma qualitativa ou quantitativa. No contexto da microbiologia forense e da análise do necrobioma, a PCR convencional permite a detecção de genes específicos de bactérias, fungos ou vírus que compõem a comunidade microbiana presente em amostras cadavéricas ou ambientais (Tomás *et al.*, 2023).

Já a PCR em tempo real (qPCR) utiliza sondas fluorescentes para quantificar, em tempo real, a abundância relativa ou absoluta desses microrganismos, sendo essencial para o monitoramento da sucessão microbiana durante a decomposição (Tomás *et al.*, 2023).

Além disso, a PCR pode ser acoplada a técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), como a amplificação do gene do RNA ribossomal 16S (em bactérias) ou 18S/ITS (em fungos), permitindo a análise metagenômica do microbioma e necrobioma. Isso é fundamental para a caracterização taxonômica e funcional das comunidades microbianas em diferentes estágios da decomposição ou em amostras forenses (Metcalf *et al.*, 2016).

A PCR também tem aplicações importantes na identificação de patógenos em casos de crimes sexuais, bioterrorismo, biocrimes, e na estimativa do intervalo post-mortem, sendo uma ferramenta central no arsenal da microbiologia forense moderna (Javan *et al.*, 2019).

As técnicas de sequenciamento de DNA transformaram profundamente a análise do microbioma, permitindo a identificação precisa, sensível e abrangente de microrganismos presentes em diferentes habitats, inclusive no corpo humano e em cadáveres em decomposição (Schloss; Handelsman, 2005).

Essas tecnologias eliminam a dependência do cultivo microbiológico, possibilitando a caracterização de uma ampla diversidade de espécies, incluindo aquelas de difícil ou impossível cultivo *in vitro* (Schloss; Handelsman, 2005). No contexto microbiológico, existem diferentes abordagens de sequenciamento,

sendo duas das mais utilizadas o sequenciamento baseado em amplicons e o metagenômico do tipo shotgun (Quince *et al.*, 2017).

O sequenciamento baseado em amplicons utiliza regiões conservadas do DNA, como o gene do RNA ribossomal 16S em bactérias e arqueias, ou as regiões ITS (internal transcribed spacer) e o gene 18S em fungos, para amplificar fragmentos específicos do genoma por PCR (Johnson *et al.*, 2019).

A partir disso, é possível identificar os microrganismos presentes até o nível de gênero ou espécie, dependendo da resolução taxonômica da região-alvo e da base de dados de referência utilizada. Essa técnica é amplamente empregada em estudos de diversidade microbiana e em investigações comparativas de microbiomas de diferentes indivíduos, regiões anatômicas ou condições fisiológicas, incluindo a decomposição cadavérica (Johnson *et al.*, 2019).

Por sua vez, o sequenciamento metagenômico do tipo shotgun, uma abordagem mais abrangente, consiste na fragmentação e subsequente sequenciação de todo o DNA presente na amostra, sem etapas de amplificação direcionada (Quince *et al.*, 2017).

Essa técnica permite tanto a identificação taxonômica quanto a caracterização funcional das comunidades microbianas, revelando genes relacionados ao metabolismo, virulência, resistência antimicrobiana e adaptação ambiental. Além disso, ela oferece maior resolução para a detecção de organismos raros ou de baixa abundância (Quince *et al.*, 2017).

Outra técnica complementar e cada vez mais utilizada é o sequenciamento de RNA total, conhecido como metatranscriptômica, que revela quais microrganismos estão metabolicamente ativos em determinado momento. Essa abordagem é essencial para compreender não apenas a composição, mas também a funcionalidade do microbioma em condições dinâmicas, como nos diferentes estágios da decomposição humana (Javan *et al.*, 2019).

A aplicação do sequenciamento de DNA na análise do microbioma traz inúmeras vantagens. Sua alta sensibilidade permite a detecção de microrganismos em concentrações extremamente baixas. A especificidade molecular garante a identificação precisa das espécies presentes nas amostras. A capacidade de detectar organismos não cultiváveis amplia significativamente o espectro de microrganismos estudáveis (Gilbert *et al.*, 2014).

Além disso, a abordagem metagenômica oferece a possibilidade de análises funcionais, indo além da simples identificação e permitindo a inferência de processos biológicos em curso (Gilbert *et al.*, 2014).

Em contextos forenses, essas técnicas têm se mostrado particularmente úteis na estimativa do intervalo post-mortem (IPM), na determinação de possíveis locais de morte ou transporte de cadáveres por meio de assinaturas microbianas ambientais (geolocalização), e até mesmo na identificação de indivíduos, uma vez que cada ser humano possui um perfil microbiano único e relativamente estável em determinadas regiões corporais (Metcalf *et al.*, 2016).

Portanto, as tecnologias de sequenciamento de DNA representam uma ferramenta poderosa e indispensável na microbiologia moderna e forense, possibilitando a compreensão mais profunda da diversidade, função e sucessão temporal dos microrganismos associados ao corpo humano vivo e em decomposição (Gilbert *et al.*, 2014).

#### 1.4.2. Análise de dados e bioinformática

A análise dos dados gerados pelas técnicas de sequenciamento de DNA em estudos do microbioma requer o uso de ferramentas de bioinformática altamente especializadas (Samuel *et al.*, 2007).

Essas ferramentas permitem o processamento, a filtragem de qualidade, a classificação taxonômica, a análise funcional e a visualização das comunidades microbianas presentes em uma amostra. Devido à grande quantidade de dados gerados por abordagens como o sequenciamento do gene 16S rRNA e o metagenômico shotgun, a bioinformática tornou-se um componente indispensável da microbiologia moderna, incluindo suas aplicações forenses (Samuel *et al.*, 2007).

Inicialmente, o pipeline bioinformático envolve etapas de pré-processamento, como a filtragem de leituras de baixa qualidade, remoção de adaptadores e eliminação de contaminantes. Softwares como FastQC e Trimmomatic são amplamente utilizados nessa fase para avaliar e refinar a qualidade dos dados brutos (Bolger *et al.*, 2014).

Na análise de sequências 16S rRNA, ferramentas como QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) e Mothur são amplamente

empregadas para agrupar sequências em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) ou amplicon sequence variants (ASVs), realizar alinhamentos e classificar os microrganismos com base em bancos de dados como SILVA, Greengenes ou RDP (Bolyen *et al.*, 2019; Schloss *et al.*, 2009).

Esses softwares também oferecem funcionalidades para a análise de alfa e beta diversidade, permitindo avaliar a riqueza, equitabilidade e dissimilaridade das comunidades microbianas entre diferentes amostras ou condições (Bolyen *et al.*, 2019).

Para dados metagenômicos do tipo *shotgun*, ferramentas como Kraken2, MetaPhlAn, MEGAN e HUMAnN são comumente utilizadas (Wood *et al.*, 2019; Beghini *et al.*, 2021).

O Kraken2, por exemplo, realiza uma classificação taxonômica ultrarrápida baseada em k-mers, enquanto o MetaPhlAn permite a identificação de microrganismos com base em marcadores específicos, oferecendo resultados de alta resolução e baixo ruído de fundo (Wood *et al.*, 2019). Já o HUMAnN (The HMP Unified Metabolic Analysis Network) permite a inferência de funções metabólicas a partir dos dados metagenômicos, proporcionando insights sobre a capacidade funcional do microbioma (Beghini *et al.*, 2021).

Além da taxonomia e função, as ferramentas de bioinformática também são fundamentais para a visualização e interpretação dos dados. Softwares como R (com os pacotes phyloseq, vegan, microbiome, ggplot2) e Python (com Biopython, pandas, seaborn) permitem a criação de gráficos, mapas de calor, análises de ordenação (como PCA, PCoA e NMDS) e redes de coocorrência microbiana (Carter *et al.*, 2007).

Essas análises são essenciais para interpretar padrões ecológicos complexos e relações entre microrganismos e variáveis ambientais ou temporais, como os estágios da decomposição cadavérica (Carter *et al.*, 2007).

Na análise do necrobioma, a aplicação de métodos estatísticos é essencial para correlacionar a composição e a dinâmica das comunidades microbianas com o tempo decorrido desde a morte (intervalo post-mortem - IPM). Esses métodos possibilitam não apenas a descrição da diversidade microbiana, mas também a modelagem preditiva e a identificação de marcadores temporais úteis em contextos forenses (Pechal *et al.*, 2014).

Com o avanço das técnicas de sequenciamento de alto rendimento, tornou-se possível gerar grandes volumes de dados que demandam métodos estatísticos mais robustos para garantir análises confiáveis, interpretação adequada e validação dos resultados. Essas ferramentas são essenciais para lidar com a natureza composicional, alta dimensionalidade e abundância de zeros típicas dos dados de microbioma obtidos por NGS, exigindo modelos específicos para esse tipo de estrutura (Zhou *et al.*, 2022).

Inicialmente, são utilizadas medidas de diversidade alfa e beta para descrever a composição e a variação das comunidades microbianas ao longo do tempo. A diversidade alfa, que reflete a diversidade dentro de uma única amostra, é geralmente avaliada por índices como o de Shannon, Simpson ou Observed OTUs (Metcalf *et al.*, 2016).

A diversidade beta, por sua vez, mede a dissimilaridade entre comunidades microbianas de diferentes amostras ou tempos post-mortem e pode ser calculada por métricas como Bray-Curtis, UniFrac (ponderado ou não ponderado) e Jaccard. Essas métricas são frequentemente representadas graficamente por meio de técnicas de ordenação multivariada, como Análise de Componentes Principais (PCA), Análise de Coordenadas Principais (PCoA) ou Análise de Escalonamento Multidimensional (NMDS), permitindo visualizar agrupamentos de amostras conforme seu estágio de decomposição (Metcalf *et al.*, 2016).

Para avaliar a correlação entre a composição microbiana e o tempo de morte, são utilizadas análises de regressão, como regressão linear múltipla, modelos lineares generalizados (GLMs) ou modelos lineares mistos (LMMs). Esses modelos consideram a abundância relativa de táxons específicos ou conjuntos de microrganismos como variáveis independentes e o tempo post-mortem como variável dependente (Javan *et al.*, 2016).

Estudos recentes têm empregado também técnicas de aprendizado de máquina, como random forest, regressão por vetores de suporte (SVR) e redes neurais, que permitem identificar padrões complexos e não lineares entre os dados microbianos e o IPM, com alto poder preditivo (Javan *et al.*, 2016).

Outra abordagem estatística bastante utilizada é a análise de variância permutacional (PERMANOVA), que permite testar se as diferenças observadas na composição microbiana entre diferentes grupos (por exemplo, tempos de

morte ou locais anatômicos) são estatisticamente significativas (Quince *et al.*, 2017).

A análise de correspondência canônica (CCA) ou redundancy analysis (RDA) também pode ser aplicada para explorar a influência de variáveis ambientais ou temporais sobre a estrutura microbiana (Quince *et al.*, 2017).

Além disso, técnicas como análise de agrupamento hierárquico e heatmaps ajudam a identificar microrganismos cuja presença ou abundância varia sistematicamente ao longo do tempo post-mortem, sugerindo seu potencial como bioindicadores temporais. Esses dados podem ser validados por meio de testes estatísticos como o teste de Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney ou ANOVA, dependendo da distribuição dos dados (Quince *et al.*, 2017).

A combinação dessas abordagens permite construir modelos matemáticos e algoritmos preditivos capazes de estimar o IPM com maior precisão do que métodos tradicionais baseados apenas em observações físicas do cadáver. Assim, os métodos estatísticos representam uma ferramenta indispensável para transformar dados genômicos em informações úteis na investigação forense (Carter *et al.*, 2007).

#### 1.4.3. Desafios e limitações das metodologias

A análise do necrobioma, embora represente uma fronteira inovadora e de alto potencial na ciência forense, depara-se com desafios técnicos substanciais e limitações metodológicas que influenciam diretamente a robustez e a padronização dos resultados. (Javan *et al.*, 2016).

Tais obstáculos permeiam todo o fluxo de trabalho, desde as etapas iniciais de coleta de amostras em campo até a complexa interpretação dos dados gerados por sequenciamento de alto desempenho e bioinformática, exigindo extrema prudência na translação desses achados acadêmicos para aplicações periciais práticas, como a estimativa do intervalo post-mortem (IPM) ou a geolocalização de cadáveres (Deel *et al.*, 2021).

Um dos entraves primordiais diz respeito à falta de consenso na padronização da coleta de amostras. Variáveis cruciais, como a escolha do sítio anatômico específico, o tempo exato decorrido até a amostragem, a técnica empregada (uso de *swabs* superficiais versus biópsias teciduais profundas) e as

condições microambientais no momento da coleta, afetam drasticamente a recuperação e a representatividade da comunidade microbiana (Kaszubinski *et al.*, 2020).

Pequenas oscilações nesses procedimentos podem introduzir vieses analíticos significativos, dificultando a reprodutibilidade entre diferentes estudos. Adicionalmente, o risco de contaminação cruzada seja pelo microbioma dos próprios peritos ou pelo ambiente não relacionado ao crime permanece uma preocupação crítica que pode distorcer os perfis finais (Robinson *et al.*, 2021).

Outro gargalo metodológico importante encontra-se na etapa de extração de ácidos nucleicos a partir de matrizes cadavéricas, que frequentemente sofrem com degradação severa devido aos processos estocásticos de autólise e putrefação. Essa degradação impacta o rendimento e a integridade do DNA e RNA, comprometendo a eficiência da construção de bibliotecas de sequenciamento e a detecção de microrganismos de baixa abundância que poderiam atuar como marcadores temporais precisos (Dash; Das., 2023).

As tecnologias de sequenciamento vigentes, apesar de revolucionárias, também impõem limitações técnicas. O sequenciamento de amplicons (como o gene 16S rRNA), por exemplo, embora custo-efetivo, restringe a análise a bactérias e arqueias, negligenciando a micobiota e o viroma, além de oferecer resolução taxonômica muitas vezes limitada apenas ao nível de gênero (Wang *et al.*, 2022). Em contrapartida, a metagenômica *shotgun*, embora ofereça uma visão funcional holística, esbarra em custos elevados, na complexidade computacional para processar volumes massivos de dados e na dificuldade técnica de distinguir o DNA microbiano em meio à vasta quantidade de DNA do hospedeiro humano (Wang *et al.*, 2022).

No âmbito da análise de dados, os bancos de referência taxonômica ainda carecem de completude, especialmente para microrganismos edáficos e decompositores não cultiváveis, o que pode resultar em classificações incorretas. A bioinformática depende de *pipelines* complexos e variados, dificultando a comparação direta entre pesquisas (Deel *et al.*, 2021). Ademais, modelos promissores de inteligência artificial para predição do IPM muitas vezes ainda não foram validados externamente em cenários de campo variados, limitando sua generalização prática (Wang *et al.*, 2022).

A influência de variáveis ambientais e biológicas constitui outro desafio de magnitude considerável. Fatores abióticos como temperatura, umidade, pH do solo e sazonalidade moldam a sucessão microbiana de maneira determinante, impedindo a aplicação simplista de um modelo universal (Noll *et al.*, 2023). Simultaneamente, a variabilidade interindividual do microbioma antemortem influenciada por dieta, fármacos e comorbidades acrescenta uma camada de complexidade que pode alterar a trajetória da decomposição (Speruda *et al.*, 2022). Finalmente, há uma lacuna na literatura quanto a estudos longitudinais controlados que integrem dados entomológicos e químicos em larga escala (Dash; Das., 2023).

A ausência de normas internacionais consolidadas e a escassez de validação empírica robusta restringem o reconhecimento do necrobioma como evidência jurídica admissível (Kaszubinski *et al.*, 2020). A padronização e a validação das técnicas são etapas cruciais para garantir a reprodutibilidade e a admissibilidade dos dados em tribunais. A falta de protocolos uniformes (SOPs) compromete a comparabilidade entre estudos e dificulta a criação de bancos de dados consistentes, limitando a aplicação prática dos achados em investigações criminais reais (Robinson *et al.*, 2021).

A padronização exige a definição de métodos consistentes para todas as etapas, desde a cadeia de custódia da amostra até a análise estatística (Kaszubinski *et al.*, 2020). Por exemplo, a escolha do local de coleta e o controle das variáveis ambientais influenciam diretamente a composição detectada. Portanto, é essencial estabelecer protocolos rigorosos para reduzir a variabilidade interexperimental e assegurar a precisão forense (Deel *et al.*, 2021).

Além disso, a validação das técnicas é indispensável para assegurar sensibilidade e especificidade. Métodos de sequenciamento e algoritmos preditivos baseados em *machine learning* precisam ser testados exaustivamente em diferentes contextos e populações antes de serem aceitos como prova científica (Wang *et al.*, 2022). Isso demanda esforços colaborativos para a realização de estudos multicêntricos e a validação cruzada dos dados gerados (Wang *et al.*, 2022).

A criação de bancos de dados de referência microbiana que considerem variações geográficas e sazonais também depende dessa padronização

metodológica. Sem isso, os perfis microbianos não podem ser comparados adequadamente em escala global, limitando o valor preditivo dos modelos estatísticos atuais. A ausência de padronização pode levar a conclusões errôneas se modelos locais forem aplicados fora de seu contexto geográfico (Noll *et al.*, 2023).

Outra dimensão vital é a aceitação legal. Para que o necrobioma seja admitido em processos judiciais, é imperativo demonstrar que os métodos são cientificamente válidos e amplamente aceitos, cumprindo critérios rigorosos como o padrão Daubert. Isso só é possível com protocolos padronizados, publicações em revistas revisadas por pares e reprodutibilidade documentada (Robinson *et al.*, 2021). Em resumo, a harmonização metodológica e a validação rigorosa são pré-requisitos para que a tanatomiologia transcenda a pesquisa acadêmica e se estabeleça como ferramenta pericial indispensável (Speruda *et al.*, 2022).

## REFERÊNCIAS

- BEGHINI, F. et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities. **eLife**, v. 10, p. e65088, 2021. DOI: 10.7554/eLife.65088.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121-141, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
- BERG, G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 103, 2020. DOI: 10.1186/s40168-020-00875-0.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 852-857, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.
- CARTER, D. O. et al. Forensic microbiology. **Forensic Science International**, v. 163, p. 1-9, 2007. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.06.062.
- COBAUGH, K. L. et al. Microbial communities and decomposition processes in forest and grassland soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 718, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00718.

- COSTELLO, E. K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 2009. DOI: 10.1126/science.1177486.
- CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 701-712, 2012. DOI: 10.1038/nrn3346.
- DAMANN, F. E.; WILSON, T. M.; CARTER, D. O. Cadaver decomposition and soil: processes. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 5, p. e204-e206, 2015. DOI: 10.1016/j.fsigss.2015.09.081.
- DASH, H. R.; DAS, S. Forensic microbiology: The next-generation investigative tool. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 6, fuad063, 2023. DOI: 10.1093/femsre/fuad063.
- DEEL, H. L. et al. The Thanatobiome: A Review of the Postmortem Microbiome and its applications in Forensic Science. **Forensic Science International**, v. 320, p. 110708, 2021. DOI: 10.1016/j.forsciint.2021.110708.
- FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, p. 577-589, 2012. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.156.
- GILBERT, J. A. et al. The Earth Microbiome Project: a global initiative to chart microbial life. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 17088, 2014. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.88.
- GOFF, M. L. Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, p. 21-36, 2009. DOI: 10.1007/s10493-009-9284-9.
- HAUTHER, R. L. et al. Human post-mortem microbiome: evidence for a translocation of bacteria from gut to organs. **Forensic Science International**, v. 247, p. 27-34, 2015. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.11.025.
- HOU, H. et al. LinDA: linear models for differential abundance analysis of microbiome compositional data. **Genome Biology**, v. 23, n. 1, p. 95, 2022. DOI: 10.1186/s13059-022-02655-5.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-214, 2012. DOI: 10.1038/nature11234.
- HUTTENHOWER, C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-214, 2012. DOI: 10.1038/nature11234.
- HYDE, E. R. et al. The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77733, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0077733.
- JAVAN, G. T. et al. The thanatobiome: a missing piece of the microbial puzzle of death. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 225, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00225.

- JAVAN, G. T. et al. Using thanatometabolome and thanatotranscriptome to estimate the postmortem interval. **Forensic Science International: Genetics**, v. 38, p. 26-34, 2019. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.10.012.
- JOHNSON, J. S. et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing of forensic samples for microbial community analysis. **Forensic Science International: Genetics**, v. 41, p. 119-126, 2019. DOI: 10.1016/j.fsigen.2019.04.013.
- KASZUBINSKI, S. F. et al. A definition of the necrobiome to facilitate communication and integration of findings across communities of decomposition researchers. **Forensic Science International: Synergy**, v. 2, p. 202-205, 2020. DOI: 10.1016/j.fsisyn.2020.06.002.
- LAUBER, C. L. et al. Comparison of DNA extraction methods for microbial community profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5111-5120, 2010. DOI: 10.1128/AEM.00007-10.
- LYNCH, S. V.; PEDERSEN, O. The human intestinal microbiome in health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2369-2379, 2016. DOI: 10.1056/NEJMra1600266.
- MADEA, B. Estimation of the time since death. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 12, p. 451-485, 2016. DOI: 10.1007/s12024-016-9817-6.
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 21-27, 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3452.
- METCALF, J. L. et al. A forensic decomposition clock based on the postmortem microbiome. **eLife**, v. 2, p. e01104, 2013. DOI: 10.7554/eLife.01104.
- METCALF, J. L. et al. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. **Science**, v. 351, n. 6269, p. 158-162, 2016. DOI: 10.1126/science.aad2646.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987. DOI: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.
- NOLL, L. et al. Dynamics of the dead: understanding the postmortem microbiome in tropical soils. **Environmental Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1125-1138, 2023. DOI: 10.1111/1462-2920.16343.
- NORMAN, J. M. et al. The role of the virome in intestinal inflammation in IBD. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 7, 2015. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.203.
- PECHAL, J. L. et al. Microbial community functional change during vertebrate carrion decomposition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e110516, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0110516.
- PECHAL, J. L. et al. A review of the potential of microbiome research for forensic applications. **Forensic Science International**, v. 289, p. 349-359, 2018. DOI: 10.1016/j.forsciint.2018.06.011.

- QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 59-65, 2010. DOI: 10.1038/nature08821.
- QUINCE, C. et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3935.
- ROBINSON, K. F. et al. The current state of forensic microbiome research and its application to casework. **Forensic Science International: Synergy**, v. 3, p. 100132, 2021. DOI: 10.1016/j.fsisyn.2020.100132.
- ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 313-323, 2009. DOI: 10.1038/nri2515.
- SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988. DOI: 10.1126/science.2448875.
- SAMUEL, M. et al. Methanobrevibacter smithii: a potent agent in the production of methane in the human colon. **PNAS**, v. 104, n. 25, p. 10667-10672, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0702035104.
- SCANLAN, P. D.; MARCHESI, J. R. Molecular analysis of the gut microbiota. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 14, 2008. DOI: 10.1097/MOG.0b013e3282f1f00a.
- SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009. DOI: 10.1128/AEM.01541-09.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. The next generation of molecular microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n. 3, p. 367-377, 2005. DOI: 10.1016/j.femsec.2005.02.008.
- SPERUDA, M. et al. The role of the microbiome in the decomposition of human remains: A review. **International Journal of Legal Medicine**, v. 136, p. 775–788, 2022. DOI: 10.1007/s00414-021-02773-z.
- TOMÁS, P. et al. Real-time PCR for the quantitative detection of Clostridium species in forensic samples. *Journal of Microbiological Methods*, v. 216, p. 106969, 2023. DOI: 10.1016/j.mimet.2023.106969.
- TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009. DOI: 10.1038/nature07540.
- UNDERHILL, D. M.; ILIEV, I. D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 405-416, 2014. DOI: 10.1038/nri3684.
- URSELL, L. K. et al. Defining the human microbiome: why sequence all the things? **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 119-126, 2012. DOI: 10.1016/j.tim.2011.12.008.

WANG, Z. et al. Advances in intelligence microbiome for postmortem interval estimation. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 841345, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1034051.

WOOD, D. E. et al. Kraken 2: efficient and accurate metagenomic classification system. **Genome Biology**, v. 20, p. 209, 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1891-0.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222-227, 2012. DOI: 10.1038/nature11234.

## 2 ARTIGO

### NECROBIOMA: A APLICAÇÃO DA MICROBIOLOGIA FORENSE

BENTO, L.E.R.F.<sup>1</sup>  
DUARTE, A.S.<sup>2</sup>

#### RESUMO

A estimativa do intervalo pós-morte (IPM) é um desafio na ciência forense, cujos métodos clássicos possuem limitações temporais. A tanatomiologia, que estuda a sucessão previsível de microrganismos (necrobioma) após a morte, emerge como uma promissora ferramenta investigativa. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre o estado da arte da tanatomiologia, descrevendo as alterações microbianas na decomposição, as metodologias de análise e discutindo seu potencial e desafios. A metodologia consistiu em uma revisão narrativa com base em artigos científicos. Os resultados demonstram um padrão sucessional previsível, com a translocação de bactérias endógenas anaeróbicas, como *Clostridium*, na fase de inchaço, e a posterior dominância de microrganismos do ambiente na decomposição ativa. A análise é majoritariamente realizada por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) do gene 16S rRNA, com modelos de *machine learning* sendo aplicados para criar "relógios microbianos". Conclui-se que a tanatomiologia possui grande potencial para a prática forense, mas sua implementação rotineira ainda é limitada pela influência de variáveis ambientais e pela falta de protocolos padronizados, demandando mais pesquisas para sua validação.

**Palavras-chave:** Microbiologia Forense. Tanatomiologia, Intervalo Pós-Morte. Sucessão Microbiana. Perícia Criminal.

#### ABSTRACT

Estimating the postmortem interval (PMI) is a challenge in forensic science, whose classical methods have temporal limitations. Thanatomiology, which studies the predictable succession of microorganisms (necrobiome) after death, is emerging as a promising investigative tool. The objective of this work was to conduct a literature review on the state of the art in thanatomiology, describing microbial changes during decomposition, analytical methodologies, and discussing their potential and challenges. The methodology consisted of a narrative review based on scientific articles. The results demonstrate a predictable successional pattern, with the translocation of endogenous anaerobic bacteria, such as *Clostridium*, during the bloating phase, and the subsequent dominance of environmental microorganisms during active decomposition.

---

<sup>1</sup> Lucas Emanuel Ryan Fagundes Bento. Acadêmico do Curso de Bacharelado em Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. Apucarana – PR. 2025.

<sup>2</sup> Andréa Sabag Duarte. Orientadora. Especialista em Biotecnologia. Docente do Curso de Bacharelado em Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. Apucarana – PR. 2025.

performed by Next-Generation Sequencing (NGS) of the 16S rRNA gene, with machine learning models being applied to create "microbial clocks." It is concluded that thanatomicrobiology has great potential for forensic practice, but its routine implementation is still limited by the influence of environmental variables and the lack of standardized protocols, requiring further research for its validation.

**Keywords:** Forensic Microbiology. Thanatomicrobiome, Postmortem Interval. Microbial Succession. Criminal Expertise.

## INTRODUÇÃO

A estimativa precisa do Intervalo Pós-Morte (IPM) é um dos pilares mais desafiadores da ciência forense, fornecendo informações cruciais para a reconstrução de eventos em uma investigação criminal (Madea, 2016). Os métodos tanatológicos clássicos, como a análise do *algor*, *livor* e *rigor mortis*, embora fundamentais, possuem uma janela de utilidade restrita, perdendo precisão significativamente após as primeiras 48 a 72 horas (Strete, *et al.*, 2025). Diante dessa limitação, a busca por novos biomarcadores que ofereçam um "relógio biológico" mais duradouro e preciso tornou-se uma prioridade na pesquisa forense (Deel *et al.*, 2021).

As comunidades de microrganismos associadas à decomposição cadavérica, coletivamente conhecidas como necrobioma, emergiram como uma ferramenta de investigação de grande potencial. O princípio fundamental por trás dessa abordagem é que, após a morte do hospedeiro e a cessação da homeostase, as comunidades microbianas sofrem uma sucessão ecológica padronizada e temporalmente previsível. Estudos pioneiros demonstraram que a composição e a abundância relativa de bactérias e fungos mudam de maneira consistente ao longo das diferentes fases da decomposição, refletindo a disponibilidade de nutrientes e as alterações físico-químicas do cadáver (Metcalf *et al.*, 2016; Javan *et al.*, 2016).

Esta sucessão microbiana é a base da tanatomicrobiologia, uma subdisciplina da microbiologia forense focada em utilizar o necrobioma para fins periciais. A análise se concentra tanto nos microrganismos endógenos, que se translocam a partir do trato gastrointestinal para outros órgãos (*thanatomicrobiome*), quanto nos microrganismos exógenos, provenientes do

ambiente circundante, como o solo (*epinecrotic microbiome*) (Hyde *et al.*, 2013; Cobaugh *et al.*, 2015).

A análise integrada dessas comunidades oferece uma linha do tempo biológica que pode complementar ou até mesmo superar outras técnicas em cenários forenses complexos, como em corpos em avançado estado de decomposição ou submersos (Finley *et al.*, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão narrativa sobre a tanatomiologia. A pesquisa buscou descrever as principais alterações nas comunidades microbianas ao longo das fases de decomposição, apresentar as metodologias mais utilizadas para a análise do necrobioma e discutir o potencial de aplicação forense desta área, bem como os desafios atuais e as perspectivas futuras para sua consolidação como ferramenta de estimativa do intervalo post-mortem.

## **METODOLOGIA**

A pesquisa se desenvolveu por meio de levantamento bibliográfico do tipo revisão narrativa, com base em artigos científicos originais publicados nas bases de dados PubMed e Google Acadêmico. Os critérios de busca incluíram os descritores em inglês combinados com o operador booleano AND da seguinte forma: "thanatomiologia" AND "necrobioma" AND "forensic microbiology" AND "postmortem interval". A análise buscou sintetizar os achados sobre a sucessão microbiana pós-morte e as técnicas laboratoriais empregadas no período compreendido entre janeiro de 2015 a junho de 2025.

Foram incluídos artigos originais na língua inglesa e portuguesa, na forma de estudos pré-clínicos (em modelos animais) e clínicos (em humanos), que descreveram as principais alterações nas comunidades microbianas ao longo das fases de decomposição e apresentaram as metodologias utilizadas para a análise do necrobioma como ferramenta de estimativa do intervalo post-mortem.

Foram excluídos trabalhos duplicados, artigos de revisão, resumos de anais, estudos incompletos ou sem acesso gratuito, além de teses, monografias e artigos que não apresentavam dados completos para os objetivos propostos.

Na busca primária foram selecionados um total de 102 trabalhos e após a leitura do título, leitura do resumo e aplicação dos critérios inclusão e exclusão, 10 trabalhos foram selecionados. Em seguida, os artigos foram analisados e suas informações foram organizadas em uma tabela de síntese para permitir a comparação dos objetivos e principais resultados de cada estudo. O processo de seleção final resultou em 4 estudos pré-clínicos e 6 estudos clínicos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos estudos originais selecionados confirma que o necrobioma não é aleatório, mas segue uma sucessão ecológica mensurável. A análise conjunta dos estudos apresentados permite construir uma narrativa coesa desse fenômeno, desde a fase fresca até a esqueletização, destacando a transição do domínio de microrganismos endógenos para os exógenos.

O avanço da tanatomiobiologia é intrinsecamente ligado ao desenvolvimento de ferramentas de sequenciamento e análise de dados, sendo um campo onde a microbiologia de alto rendimento (*high-throughput*) e a inteligência artificial (IA) convergem.

O quadro 1 ilustra de forma clara os microrganismos que foram encontrados a cada fase de decomposição, o modelo experimental, tipo de amostra, metodologia aplicada para análise, fase associada e os principais achados.

**Quadro 1: Microrganismos associados a cada fase de decomposição**

| Referência<br>(Autor, Ano)            | Modelo<br>Experimental | Tipo de Amostra/<br>Ambiente/<br>Metodologia | Fase Associada e Principais<br>Achados                                                                                     |
|---------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Martínez<br>Aragonés et<br>al. (2022) | Modelo murino          | Intestino/<br>Sequenciamento<br>16S rRNA     | <b>Fase fresca (0-12h):</b> aumento de bactérias aeróbicas que consomem o oxigênio residual.                               |
| Zhang et al.<br>(2019)                | Animal (Ratos)         | Ceco e reto/<br>Sequenciamento<br>16S rRNA   | <b>Fase fresca (0-48h):</b> comunidade intestinal permanece estável, refletindo o estado <i>ante-mortem</i> .              |
| DeBruyn;<br>Hauther<br>(2017)         | Cadáver<br>humano      | Intestino/<br>Sequenciamento<br>16S rRNA     | <b>Fase Fresca:</b> estrutura comunitária semelhante à <i>in vivo</i> , com alta abundância de Firmicutes e Bacteroidetes. |

|                                |                          |                                                                      |                                                                                                                                                                |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Adserias-Garriga et al. (2017) | Humano (Doadores)        | Cavidade oral/ Sequenciamento NGS                                    | <b>Fase inicial à inchaço:</b> microbiota nativa ( <i>Streptococcus</i> ) é substituída por bactérias de decomposição ( <i>Clostridium</i> , <i>Proteus</i> ). |
| Tozzo et al. (2020)            | Humano (22 autópsias)    | Swabs (nariz, boca, olhos, reto) /qPCR e 16S rRNA                    | <b>Fase fresca à inchaço:</b> região retal mostra a sucessão mais consistente; proliferação de Gammaproteobacteria.                                            |
| Cobaugh et al. (2015)          | Cadáver humano           | Solo sob o corpo/ Sequenciamento 16S rRNA                            | <b>Decomposição ativa:</b> aumento de Proteobacteria e Firmicutes no solo (ilha de decomposição).                                                              |
| Finley et al. (2015)           | Cadáver humano           | Tecido intestinal e solo/ Sequenciamento <i>Shotgun</i> Metagenômico | <b>Decomposição ativa:</b> interação entre micróbios do intestino (Clostridiaceae, Enterobacteriaceae) e do solo.                                              |
| Noll et al. (2023)             | Humano (CDI)             | Solo tropical sob o corpo/ Metagenômica                              | <b>Decomposição ativa/ avançada:</b> dominância de Actinobacteria e Proteobacteria; forte influência do clima tropical.                                        |
| Procopio et al. (2019)         | Animal (Suínos)          | Ossos (Fíbula)/ Sequenciamento Massivo ( <i>Metabarcoding</i> )      | <b>Fase esquelética:</b> persistência de gêneros como <i>Pseudomonas</i> e <i>Clostridium</i> meses após a morte.                                              |
| Belk et al. (2018)             | Animal (Suínos) e Humano | Pele e solo/ <i>Machine Learning</i>                                 | <b>Várias fases:</b> uso de algoritmos para correlacionar o padrão de Firmicutes e Bacteroidetes com o IPM.                                                    |

Fonte: elaborado pelos autores (2025).

### Sucessão microbiana durante o processo de decomposição cadavérica

As primeiras horas após a morte são marcadas por uma relativa estabilidade do microbioma intestinal, que ainda reflete o estado do indivíduo em vida. Estudos em cadáveres humanos demonstram que, nesse estágio, a comunidade intestinal mantém uma estrutura semelhante à *in vivo*, com alta abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (DeBruyn; Hauther, 2017). Esse período de latência é corroborado por pesquisas em modelos animais; Zhang *et al.* (2019) estabeleceram que a comunidade bacteriana do ceco de ratos permanece estável por até 48 horas.

Contudo, o evento disparador da sucessão já ocorre nesse período: com a cessação da circulação, o oxigênio residual nos tecidos é rapidamente consumido, um processo evidenciado por Martínez Aragonés *et al.* (2022), que

observaram um aumento de bactérias aeróbicas nas primeiras 12 horas em um modelo murino. Esta anóxia iminente prepara o terreno para a próxima fase.

Com a depleção do oxigênio, ocorre uma mudança drástica no domínio. Anaeróbios facultativos e estritos, que já residiam no corpo, iniciam uma proliferação massiva. Esse fenômeno é claramente observado por Adseries-Garriga *et al.* (2017) na cavidade oral, onde a microbiota nativa e aeróbica (como *Streptococcus*) é progressivamente substituída por bactérias de decomposição, como *Clostridium* e *Proteus*. Este processo não se limita à boca. Tozzo *et al.* (2020) demonstraram, analisando múltiplas partes do corpo, que a região retal apresenta a sucessão mais consistente para a estimativa de IPM, com uma forte correlação entre o tempo de morte e a proliferação de Gammaproteobacteria e o declínio de Firmicutes. A proliferação desses microrganismos e sua atividade metabólica são responsáveis pela produção de gases e pelo início da putrefação.

À medida que a integridade física do corpo é comprometida, a barreira entre o ambiente interno e externo se desfaz, e a sucessão microbiana passa a ser dominada por microrganismos exógenos, principalmente do solo. Os trabalhos de Cobaugh *et al.* (2015) e Finley *et al.* (2015) são fundamentais para entender essa fase.

Cobaugh e colaboradores (2015), descrevem a formação da "ilha de decomposição cadavérica" (CDI), uma área no solo sob o corpo que se torna um "hotspot" de atividade microbiana, com um aumento drástico de filos do solo como Proteobacteria. Complementarmente, Finley *et al.* (2015), detalham a interação direta entre os microrganismos intestinais em vazamento, como Clostridiaceae e Enterobacteriaceae, e a comunidade do solo.

A importância do ambiente fica ainda mais evidente no estudo de Noll *et al.* (2023), que, ao analisar a decomposição em solos tropicais, demonstrou que as condições climáticas locais influenciam fortemente a dinâmica, favorecendo Actinobacteria e Proteobacteria. Isso ressalta que, embora o processo de sucessão seja universal, os *protagonistas* microbianos podem variar regionalmente.

A tanatomiologia não se encerra com a decomposição dos tecidos moles. Procopio *et al.* (2019) trouxeram uma contribuição fundamental ao mostrar que, mesmo na fase de esqueletização, os ossos abrigam uma

comunidade microbiana distinta e persistente. Gêneros como *Pseudomonas* e *Clostridium* foram detectados em ossos meses após a morte, sugerindo que o “relógio microbiano” pode continuar a funcionar por períodos muito mais longos do que se pensava.

Finalmente, todo esse conhecimento biológico complexo precisa ser traduzido em uma ferramenta forense aplicável. O estudo de Belk *et al.* (2018) representa essa ponte, ao demonstrar que algoritmos de *machine learning* podem analisar a composição microbiana de múltiplas fases simultaneamente para prever o IPM com alta acurácia, consolidando o potencial prático de todos os achados biológicos descritos.

### **Principais metodologias para análise do necrobioma**

O potencial de aplicação forense reside na capacidade de transformar dados complexos de sequenciamento em estimativas de tempo precisas. Estudos como o de Belk *et al.* (2018) demonstraram a eficácia do algoritmo *Random Forest* (um tipo de *Machine Learning*) para correlacionar o perfil microbiano com o IPM.

A combinação de dados de múltiplos sítios anatômicos, como testado por Tozzo *et al.*, 2020, com modelos de IA é a abordagem mais promissora para reduzir a margem de erro. Os resultados, quando aplicados a modelos robustos, frequentemente superaram os métodos tafonômicos tradicionais após as primeiras 72 horas *post-mortem*.

O avanço da tanatomiologia está intrinsecamente ligado à evolução das tecnologias moleculares, que superaram as limitações dos métodos de cultivo tradicionais (Kumari; Yadav, 2023). A abordagem predominante na literatura para caracterizar o tanatomiobioma é o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), focado no gene marcador 16S rRNA para bactérias (Fu *et al.*, 2018).

Essa técnica permite a identificação taxonômica de centenas de milhares de sequências de DNA bacteriano diretamente da amostra (ex: swab de pele, tecido de órgão, amostra de solo), revelando "quem está lá" e em qual abundância relativa. Praticamente todos os estudos de sucessão microbiana,

desde os pioneiros de Hyde *et al.* (2013; 2015) até os mais recentes de Noll *et al.* (2023), utilizam esta metodologia como base.

Para uma análise mais aprofundada, a metagenômica (shotgun metagenomics) tem sido aplicada para sequenciar todo o DNA presente na amostra. Essa abordagem não apenas melhora a resolução taxonômica, mas também revela o potencial funcional da comunidade, ou seja, "o que eles podem fazer", ao identificar genes envolvidos em vias metabólicas de decomposição (Finley *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2018).

A metodologia padrão para a caracterização do necrobioma tem sido o sequenciamento do gene 16S rRNA, que permite a identificação taxonômica (DeBruyn; Hauther, 2017; Cobaugh *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019; Martínez Aragonés *et al.*, 2022).

Contudo, estudos incorporaram o qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) para quantificar biomarcadores específicos (Tozzo *et al.*, 2020) e a *Metagenômica Shotgun* (Finley *et al.*, 2015; Noll *et al.*, 2023) para obter informações funcionais, além da taxonomia.

A grande quantidade de dados gerada por essas técnicas exige análises bioinformáticas e estatísticas robustas. Nesse sentido, modelos de aprendizado de máquina (*machine learning*), como o *Random Forest Regression*, têm se mostrado altamente eficazes para correlacionar a composição do microbioma com o IPM e criar os chamados "relógios microbianos" preditivos. Estudos demonstraram que esses modelos podem estimar o IPM com um alto grau de acurácia, superando em muito a simples observação de táxons isolados (Belk *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022).

## **Potencial de aplicação, desafios e perspectivas da Tanatomiologia Forense**

O corpo de evidências acumulado sugere um vasto potencial de aplicação da tanatomiologia como ferramenta forense. Sua principal vantagem reside na onipresença dos microrganismos. O estudo da sucessão microbiana é particularmente promissor em cenários forenses complexos, como em corpos submersos, enterrados ou em ambientes fechados, onde a atividade

de indicadores clássicos, como os insetos, é limitada ou ausente (Deel *et al.*, 2021; Kumari; Yadav, 2023).

No entanto, a transição da pesquisa para a aplicação rotineira em tribunais enfrenta desafios atuais significativos, consistentemente apontados na literatura. O principal deles é a influência de variáveis externas e internas. Fatores ambientais como temperatura, umidade e tipo de solo podem alterar drasticamente a velocidade e o padrão da sucessão microbiana, exigindo a criação de bancos de dados que sejam geograficamente e climaticamente específicos (Noll *et al.*, 2023).

Da mesma forma, fatores intrínsecos ao indivíduo, como a causa da morte, o microbioma original e o uso de antibióticos perimortem, podem introduzir variações que confundem os modelos preditivos (DeBruyn; Hauther, 2017). Adicionalmente, a área ainda carece de protocolos padronizados para coleta, armazenamento e análise bioinformática das amostras, dificultando a reprodutibilidade e a comparação entre diferentes estudos (Wang *et al.*, 2022).

As perspectivas futuras da tanatomiologia são direcionadas a superar esses desafios. Há um chamado claro na comunidade científica para a realização de estudos de validação em larga escala, com um maior número de cadáveres humanos em diferentes condições (Fu *et al.*, 2018).

A integração de dados "multi-ômicos", combinando metagenômica (DNA) com metatranscritômica (RNA ativo) e metabolômica (produtos metabólicos), promete fornecer uma visão muito mais funcional e precisa do processo de decomposição (Javan *et al.*, 2016). Por fim, o contínuo aprimoramento de modelos de inteligência artificial será fundamental para integrar todas essas variáveis complexas e desenvolver um "relógio microbiano" vigoroso e confiável para a prática forense (Wang *et al.*, 2022).

## CONCLUSÃO

A aplicação da microbiologia forense, particularmente por meio do estudo do necrobioma, configura-se como uma área em franco desenvolvimento e de notável potencial para a ciência forense. Apesar desse promissor horizonte, a disciplina enfrenta desafios significativos, como a falta de padronização metodológica, a influência de variáveis ambientais e a considerável variabilidade

interindividual, os quais ainda limitam sua aplicação rotineira e reconhecimento jurídico.

Superar essas limitações depende diretamente de investimentos em pesquisa, da validação de protocolos em larga escala e da criação de bancos de dados robustos e geograficamente representativos. Uma vez aprofundados tais aspectos, a microbiologia forense poderá se consolidar como uma ferramenta complementar de alta precisão, oferecendo insights cruciais para a elucidação de crimes e a reconstituição de eventos *perimortem*, contribuindo assim de forma definitiva para a justiça e o avanço da perícia criminal.

## REFERÊNCIAS

ADSERIAS-GARRIGA, J. et al. Dynamics of the oral microbiota as a tool to estimate time since death. **Journal of Forensic Sciences**, v. 62, n. 5, p. 1307-1316, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13421>.

BELK, A. et al. Microbiome data accurately predicts the postmortem interval using random forest regression models. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 104, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes9020104>.

COBAUGH, K. L. et al. Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130201, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130201>.

DEBRUYN, J. M.; HAUTHER, R. L. Post-mortem succession of gut microbial communities in deceased humans. **PeerJ**, v. 5, p. e2856, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.2856>.

DEEL, H. L. et al. The Thanatobiome: A Review of the Postmortem Microbiome and its applications in Forensic Science. **Forensic Science International**, v. 320, p. 110708, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110708>.

FINLEY, S. J. et al. Microbial analysis of gut tissue and soil from a cadaver yield new insights into postmortem microbial interactions. **International Journal of Legal Medicine**, v. 130, n. 2, p. 551-557, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1281-4>.

FU, X. et al. Application of high-throughput sequencing in cadaver microorganisms and postmortem interval estimation. **Fa Yi Xue Za Zhi**, v. 34, n. 3, p. 221-225, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.12116/j.issn.1004-5619.2018.03.009>.

HYDE, E. R. et al. The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77733, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077733>.

HYDE, E. R. et al. Initial insights into bacterial succession during human decomposition. **International Journal of Legal Medicine**, v. 129, n. 3, p. 661–671, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1128-4>.

JAVAN, G. T. et al. The thanatobiome: a missing piece of the microbial puzzle of death. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 225, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00225>.

KUMARI, P.; YADAV, S. Investigating the Post-Mortem Interval (PMI) with Forensically Important Necrobiomes. **Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 97-103, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v17i3.19496>.

MADEA, B. Estimation of the Time Since Death. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2-3, p. 182-184, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.017>.

MARTÍNEZ ARAGONÉS, P. et al. Dynamic Changes of the Gut Microbiota in the First 12 Hours Postmortem in a Mouse Model. **Journal of Forensic Sciences**, v. 67, n. 4, p. 1585-1594, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15026>.

METCALF, J. L. et al. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. **Science**, v. 351, n. 6269, p. 158-162, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aad2646>.

NOLL, L. et al. Dynamics of the dead: understanding the postmortem microbiome in tropical soils. **Environmental Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1125-1138, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16343>.

PROCOPIO, N. et al. Metabarcoding to investigate changes in soil microbial communities within forensic burial contexts. **Forensic Science International: Genetics**, v. 39, p. 73-85, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.12.002>.

STRETE, G. et al. Current Understanding and Future Research Direction for Estimating the Postmortem Interval: A Systematic Review. **Diagnostics**, v. 15, n. 15, p. 1954, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics15151954>.

TOZZO, P. et al. Effects of extended postmortem interval on microbial communities in organs of the human cadaver. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 569630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569630>.

WANG, Z. et al. Advances in intelligence microbiome for postmortem interval estimation. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 841345, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1034051>.

ZHANG, J. et al. Predicting the postmortem interval of rat cadavers based on the changes in the rectal bacterial community. **Forensic Science International**, v. 301, p. 20-29, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.011>.

### 3 ANEXO A - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – REVISTA F@P CIÊNCIA

Os artigos encaminhados serão submetidos à avaliação de até três consultores especialistas na área e à aprovação do Comitê Editorial da F@P CIÊNCIA, com base em suas Normas Próprias de Publicação.

O ISSN da revista eletrônica é **1984-2333** e o título abreviado é **F@P Cien.**, forma que deve ser usada em bibliografias, notas de rodapé, referências e legendas bibliográficas.

São aceitos trabalhos nas seguintes seções:

1. **Revisão** – revisão da literatura;
2. **Artigos** – resultado de pesquisa empírica, experimental ou conceitual (mínimo de 5 e máximo de 12 laudas);
3. **Notas** – resultados parciais ou preliminares de pesquisa;
4. **Resenhas** – crítica de livros publicados nos últimos 5 anos (máximo de 3 páginas);
5. **Fórum** – 2 a 3 artigos coordenados sobre tema de interesse atual.

**Submissão:** somente em formato eletrônico ([fapciencia@fap.com.br](mailto:fapciencia@fap.com.br)), no papel A4, com as seguintes normas:

- Arquivo em “.doc” ou “.rtf”;
- Margens sup./esq. 3 cm e inf./dir. 2 cm;
- Fonte Arial 12 no corpo do texto; notas de rodapé em Times New Roman 10, alinhadas à esquerda;
- Espaçamento 1,5 cm.

#### **Elementos obrigatórios:**

- Textos em português; figuras, gráficos e tabelas em JPG/JPEG/GIF inseridos no corpo do texto, conforme normas da ABNT;

- Nota de rodapé com identificação do(s) autor(es): nome completo, instituição, financiador (se houver), ano e e-mail de contato (Times 10, alinhado à esquerda, espaçamento simples);

- **Resumo e Abstract:** título “RESUMO/ABSTRACT” em Arial 12, negrito e caixa alta; texto em Arial 12, sem negrito, 100–250 palavras, com 3 a 5 palavras-chave (iniciais maiúsculas, separadas por ponto), conforme NBR 6022.

**Estrutura para artigos:** devem conter **INTRODUÇÃO, OBJETIVOS, METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO, CONCLUSÃO e REFERÊNCIAS** (em caixa alta, Arial 12, não numerados).

**Citações e referências:**

- Citações conforme NBR 10520 (com número de página em citações diretas);
- Referências conforme normas ABNT, seguindo modelos do Guia de Normas da FAP.

**Observação:** os autores são inteiramente responsáveis pelo conteúdo, revisão gramatical e adequação às normas