RELATÓRIO FINAL DE ACOMPANHAMENTO DAS ATIVIDADES DO BOLSISTA PIBIC – ICMBIO

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE AVES SILVESTRES
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PIBIC/ICMBio

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA CLOACAL E DE OROFARINGE DE PAPAGAIOS-DE-CARA-ROXA (*AMAZONA BRASILIENSIS*) EM VIDA LIVRE

Rafael Meurer

Patricia Pereira Serafini

Florianópolis

02 – 2014

1.1 Resumo

O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é um psitacídeo ameaçado de extinção, endêmico da Mata Atlântica que distribui-se ao longo de faixa litorânea do sul de São Paulo ao norte de Santa Catarina. Segundo censo populacional realizado em 2014 pela Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental mais de 70 % da população (cerca de 7000 indivíduos) se encontra no Paraná. Entre as ações previstas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica está a caracterização do perfil sanitário das populações de papagaio-de-peito-roxo, papagaio-charão e papagaio-de-cara-roxa em vida livre. O objetivo deste estudo foi identificar a microbiota cloacal e de orofaringe dos papagaios-de-cara-roxa amostrados, relacionar a mesma com eventual causa de doença e, principalmente, determinar padrões sanitários normais de indivíduos saudáveis na área amostrada. Foram realizadas quatro expedições de campo para a Ilha Rasa, no litoral paranaense, contemplando o período reprodutivo de 2013/2014 o que originou a coleta de 41 amostras cloacais e orais de filhotes de *Amazona brasiliensis*. Ensaios microbiológicos e bioquímicos foram realizados seguindo metodologia padronizada (WINN *et al*. 2012). Por fim, foram isoladas 125 colônias que culminaram com a identificação de 12 gêneros de bactérias. A maior prevalência de bactérias Gram-negativas leva a concluir que, em aspectos gerais, os ninhegos amostrados estavam dentro das normalidades sanitárias, considerando as condições de higiene nos ninhos e resultados de estudos similares com outras espécies. Obtendo referências para o conhecimento da microbiota natural, é possível fazer seu uso como potencial ferramenta para o monitoramento e conservação.

1.2 Abstract

The Red-tailed Amazon Parrot (*Amazona brasiliensis*) is an endangered and endemic to the Atlantic Forest, the species is distributed from the south coast of São Paulo state to the northern coast of Santa Catarina state. According to the population census conducted in 2014 by the Society for Wildlife Research and Environmental Education more than 70% of the population (about 7.000 individuals) is in Paraná. Among the actions set out in the National Action Plan for the Conservation of Parrots of the Atlantic Forest is the characterization of the health profile of populations of Vinaceous Parrot, Red-spectacled Parrot and Red-tailed Parrot in the wild. The aim of this study was to identify the cloacal and oropharyngeal of Red-tailed Amazon Parrot sampled, also relate microbiota to potential cause of illness and mainly determine health patterns of normal healthy individuals in the sampled area. Four field expeditions to Rasa Island were realized in the Paraná coast, contemplating the reproductive period of 2013/2014 which resulted in the collection of 41 oral and cloacal samples of nestlings *Amazona brasiliensis*. Microbiological and biochemical tests were performed following standard methodology (WINN et al. 2012). Finally, 125 colonies that led to the identification of 12 genera of bacteria were isolated. The higher prevalence of Gram-negative bacteria leads to the conclusion that in general aspects, the nestlings were sampled within the sanitary normality, considering the hygiene conditions in the nests and results of similar studies with other species. Getting references to the knowledge of natural microbiota, it is possible to use this information as a potential tool for populations monitoring and conservation.

2.1 Lista de Figuras e Tabelas

FIGURA 1 - Indivíduo de *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758).....7

FIGURA 2 - Mapa mostrando a fragmentação de hábitat no estado do Paraná ao longo de cem anos.....8

FIGURA 3 – Mapa da costa do Paraná mostrando a APA de Guaraqueçaba, destacando a ilha Rasa.....12

FIGURA 4 - Auxiliar de campo da SPVS acessando um ninho artificial de madeira, através de técnicas de escalada vertical.....14

FIGURA 5 - Bolsista PIBIC (Rafael Meurer) inoculando as colônias de bactérias fermentadoras para o kit de enterobactérias dentro da cabine de fluxo unidirecional.....16

FIGURA 6 - A) Colônias de *Escherichia coli* em ágar MacConckey; B) Colônias de *Klebsiella oxytoca* em ágar Mac Conckey.....19

TABELA 1 - Datas das expedições de campo para a ilha Rasa, PR, representante do CEMAVE e número de indivíduos amostrados em cada expedição, respectivamente.....14

TABELA 2 - Prevalência de bactérias isoladas nos três tipos de ninhos amostrados durante o estudo, o ninho natural foi descartado das análises estatísticas devido ao baixo valor amostral (n =2).....19

2.2 Lista de abreviaturas

APA – Área de Proteção Ambiental

BHI - *Brain Heart Infusion*

CEMAVE - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres

EPM – Ágar inclinado verde para realização de provas de LTD, glicose, gás e H_2S

ESEC – Estação Ecológica

LTD – L-Triptofano

MIO – Motilidade, Indol e Ornitina

PAN – Plano de Ação Nacional

PIBIC – Programa de Iniciação Científica

PVC - Cloreto de polivinila

SPVS – Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental

TSI – *Triple Sugar Iron*

UFPR – Universidade Federal do Paraná

3. Sumário

4. Introdução.....7

5. Material e Métodos.....12

6. Resultados.....18

7. Discussão.....20

8. Agradecimentos.....22

9. Citações e referências bibliográficas.....23

4. Introdução

São conhecidos poucos efeitos das doenças infecciosas sobre as populações naturais de aves (LAFFERTY; GERBER, 2002). A espécie em estudo, o Papagaio-de-cara-roxa, *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758) (Figura 1) é endêmica do bioma Mata Atlântica e era distribuída em uma faixa contínua com mais de 3.000 km^2 entre o litoral sul de Santa Catarina e o litoral norte de São Paulo (DIEFENBACH; GOLDHAMMER, 1986; SCHERER-NETO, 1989). Atualmente esta faixa contínua de hábitat não existe mais devido a grande perda de área do bioma nos últimos anos e consequente fragmentação (Figura 2). No último senso realizado pela SPVS no período reprodutivo de 2012 a população de *Amazona brasiliensis* era de 6.700 indivíduos, e destes, praticamente 75 % encontram-se no litoral do Paraná (SPVS, 2012).

Figura 1: Indivíduo de *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758) (SPVS, 2012).

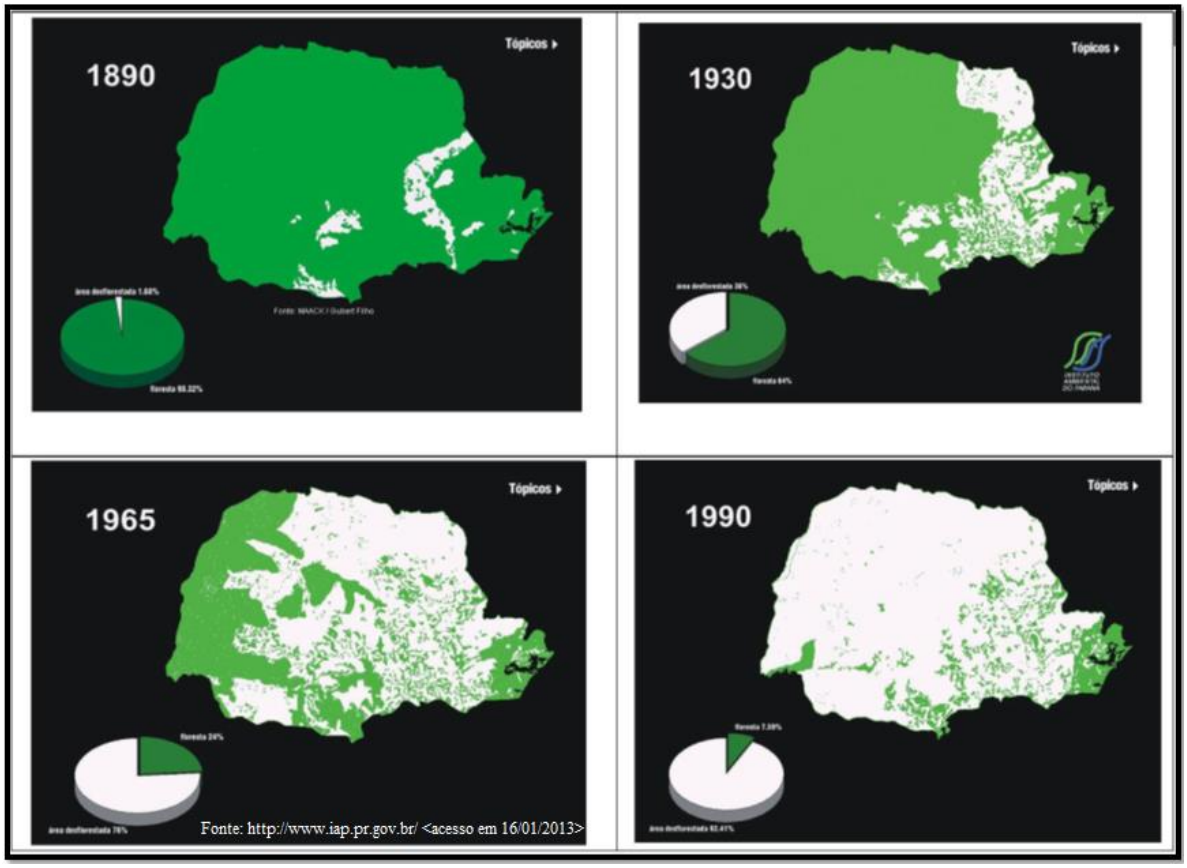

Figura 2: Mapa mostrando a fragmentação de hábitat no estado do Paraná ao longo de cem anos (IAP, 2000).

O estudo epidemiológico de uma espécie ameaçada de extinção inicia-se com a determinação dos agentes infecciosos comuns nas populações naturais, os quais provavelmente co-evoluíram com a espécie e representam baixo risco de epidemias (AGUIRRE *et al*. 2012). A invasão de espécies exóticas, incrementada pela globalização, permite que agentes infecciosos exóticos se disseminem rapidamente em populações nativas suscetíveis, estas por não terem evoluído paralelamente com estes agentes, não possuem defesas naturais (COOPER, 1993).

Assim como a maioria dos psitacídeos, o papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) apresenta o comportamento social gregário que pode ser uma importante variável em possíveis transmissões de patógenos (SICK, 1997; AGUIRRE *et al*. 2012), já que podem

se agregarem com mais de mil espécimes em alguns dormitórios com área reduzida (CARRILLO *et al*. 2002).

Os psitacídeos são especialmente vulneráveis à destruição e distúrbios ambientais, sendo a perda de habitat o principal fator para a redução de muitas populações, além da introdução de espécies predadoras ou competidoras, populações naturalmente reduzidas, perseguição humana para comércio, caça e coleta de ovos (GALETTI; PIZO, 2002). Estima-se que cerca de 360 filhotes do papagaio-de-cara-roxa foram capturados em apenas um ano no município de Cananéia, São Paulo (MARTUSCELLI, 1995).

O papagaio-de-cara-roxa consta na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2003; MACHADO, 2008), juntamente com outros três representantes do gênero: o papagaio-de-peito-roxo, *Amazona vinacea* (KUHL, 1820); o chauá, *Amazona rhodocorytha* (SALVADORI, 1890) e o papagaio-charão, *Amazona pretrei* (TEMMINCK, 1830). As quatro espécies ameaçadas do gênero *Amazona* estão no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica - PAN Papagaios, elaborado em 2010 e publicado em 2011, que tem como objetivo garantir a integridade genética e demográfica das populações naturais das espécies-alvo por meio da ampliação do conhecimento científico, da redução da perda de hábitat e da retirada de espécimes da natureza para o tráfico até 2016 (SCHUNCK *et al*. 2011).

O projeto de conservação do papagaio-de-cara-roxa, executado pela SPVS desde 1998, desenvolve pesquisas na área de ecologia, etologia, conservação, patologia clínica, parasitologia e virologia da população natural da espécie na sua área de distribuição na costa paranaense. Esta instituição tem sido uma das principais articuladoras para a implementação de ações previstas no PAN Papagaios, envolvendo-se ativamente em todas as atividades relacionadas a conservação desta espécie.

Importante destacar que o corte seletivo de espécies vegetais arbóreas associado à supressão vegetacional do ambiente natural reduziram a disponibilidade de ninhos naturais para a reprodução de papagaios-de-cara-roxa no ambiente natural e a equipe da SPVS vem utilizando há alguns anos ninhos artificiais na tentativa de minimizar este impacto na reprodução desta espécie. Tanto ninhos de madeira como de PVC foram utilizados desde o início de sua disponibilização e a taxa de ocupação de ninhos artificiais é extremamente alta ao ser comparada com a de outros projetos de conservação de psitacídeos que forneçam ninhos artificiais (DITTRICH *et al.* 2013). Compreender como estes ninhos artificiais afetam a saúde dos filhotes é uma variável adicional ao monitoramento da saúde das populações naturais.

Este trabalho trata-se da implementação da Ação 3.9 do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios Ameaçados da Mata Atlântica que está sob articulação e responsabilidade da equipe do CEMAVE/ICMBio com a participação e apoio de diversos colaboradores (***Ação 3.9 PAN Papagaios: Caracterizar o perfil sanitário das populações do papagaio-de-peito-roxo, papagaio-charão e o papagaio-de-cara-roxa em vida livre***). Uma vez que este projeto propõe a investigação ampla dos parâmetros sanitários destas espécies ameaçadas de papagaios do gênero Amazona e a implementação de ações do PAN Papagaios, sua continuidade com a investigação de outros patógenos e indicadores de saúde destas aves é bastante importante e diversas linhas de pesquisa relacionadas devem ainda ser realizadas a fim de que se tenha a compreensão plena da saúde destas espécies e, por consequencia, dos ambientes naturais em que as mesmas persistem.

O objetivo da investigação específica prevista para execução durante o período da bolsa PIBIC foi, ao identificar a microbiota cloacal e de orofaringe dos papagaios-de-cara-roxa amostrados, relacionar a mesma com eventual causa de doença, com o tipo de ninho

disponível e, principalmente, determinar os padrões sanitários normais de indivíduos saudáveis capturados na APA de Guaraqueçaba e região, abordando desta maneira a saúde das populações naturais locais.

5. Material e Métodos

A área onde este estudo foi realizado, Ilha Rasa (25° 15' e 25° 30' Sul e 48° 20' e 48° 30' Oeste), está localizada no litoral norte do estado do Paraná, na região de Guaraqueçaba. É protegida por lei, segundo o Sistema Nacional de Unidades de Conservação - SNUC (Lei n° 9.985, de 2000), como área de proteção ambiental (APA) (Figura 3).

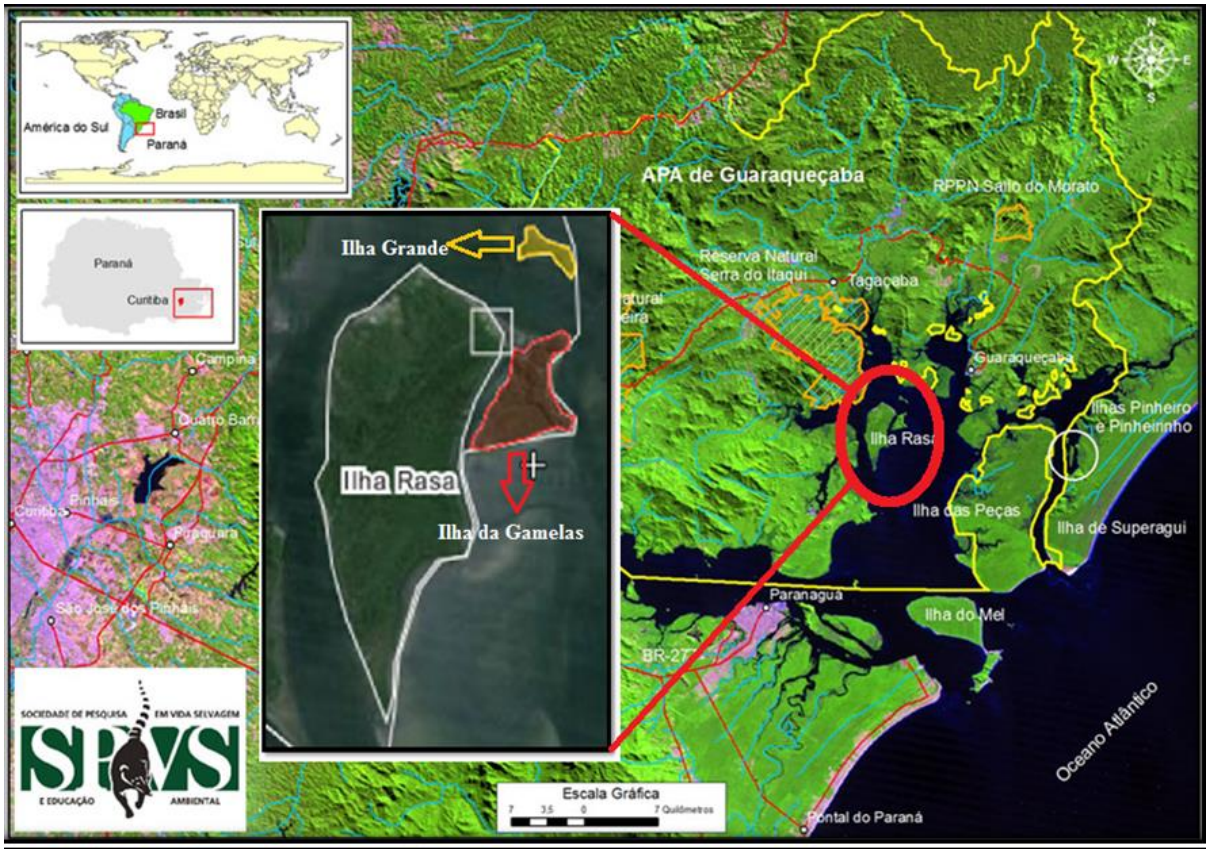

Figura 3: Mapa da costa do Paraná mostrando a APA de Guaraqueçaba, destacando a ilha Rasa (SPVS, 2012).

Foram realizadas quatro expedições de campo, durante o período reprodutivo de 2013/2014 e todas, com chegada à ilha na segunda-feira partindo na quarta-feira, retornando à Florianópolis, Santa Catarina para o processamento das amostras no laboratório da ESEC de Carijós. As quatro expedições de campo (Tabela 1) foram realizadas pelo bolsista PIBIC ou pela orientadora, além dos integrantes do Projeto de Conservação do Papagaio-de-cara-roxa,

sendo, inviável logisticamente a participação de ambos devido à rotina de análises laboratoriais que demanda um esforço diário e ininterrupto.

Tabela 1: Datas das expedições de campo para a ilha Rasa, PR, representante do CEMAVE e número de indivíduos amostrados em cada expedição, respectivamente.

Data	Representante do CEMAVE	Número de filhotes amostrados
16, 17 e 18 Dez/2013	Patricia Pereira Serafini	12
13,14 e 15 Jan/2014	Rafael Meurer	16
20, 21 e 22 Jan/2014	Patricia Pereira Serafini	13
03, 04 e 05 Fev/2014	Rafael Meurer	00

Cada ninho avistado foi acessado através de técnicas de escalada vertical (Figura 4) e os filhotes contidos manualmente. Os espécimes passaram por uma avaliação clínico-física pelo médico-veterinário da UFPR e/ou do CEMAVE, foram anilhados com anilhas metálicas padrão CEMAVE de acordo com a Instrução Normativa 27 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis de 2002 e ocorreram coletas biométricas e biológicas de cloaca e de orofaringe com *swabs* estéreis de haste plástica.

Figura 4: Auxiliar de campo da SPVS acessando um ninho artificial de madeira, através de técnicas de escalada vertical (MEURER, 2014).

Imediatamente após a coleta do material biológico, os *swabs* foram armazenados em meio de transporte Stuart – ácido tioglicólico 0,76 g/l; glicerofosfato de sódio 10,0 g/l; cloreto de cálcio 0,1 g/l; azul de metileno 0,002 g/l; ágar 6,5 g/l com pH ajustado para 7,4. Chegando ao laboratório da ESEC de Carijós, as amostras foram semeadas em caldo BHI, um meio muito nutritivo para os microrganismos onde ficaram durante vinte e quatro horas a 37ºC dentro da estufa. Posteriormente, todas as amostras foram congeladas a – 20ºC com 30 % de glicerina para conservar as estruturas celulares dos microrganismos.

Semanalmente foram descongeladas de 10 a 16 amostras (dependendo da disponibilidade do aluno PIBIC) e cada uma, estriada em placas de petri com ágar sangue e ágar MacConkey (este último inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos) e acondicionadas em estufa a 37ºC por vinte e quatro horas, posteriormente, foram feitas a caracterização morfológica das colônias que cresceram, a técnica de coloração de Gram e a verificação se a colônia possui ou não a enzima catalase através de reação com H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) para auxílio na futura identificação da espécie. Cada colônia pura foi

inoculada no ágar TSI por picada e estria na superfície inclinada e ficou à 37ºC durante vinte e quatro horas, através deste meio de cultura é possível observar a fermentação de carboidratos, produção de H_2S e gás.

Por último, a colônia identificada como fermentadora é inoculada no conjunto de provas bioquímicas para identificação de enterobactérias (Figura 5), que é composto por cinco tubos de diferentes meios: 1) meio de EPM – é possível identificar a produção de gás a partir de glicose, produção de H_2S e desaminação do triptofano; 2) caldo lisina – identificamos a descarboxilação da lisina; 3) meio de MIO – permite observar a motilidade, descarboxilação da ornitina e produção de indol; 4) ágar citrato de Simmons – identifica as bactérias que utilizam o citrato como única fonte de carbono e 5) caldo Rhamnose – utilização da Rhamnose. Após a inoculação das colônias nos kits de enterobactérias, eles foram mantidos por quarenta e oito horas a 37ºC na estufa, com a leitura e interpretação em vinte e quatro horas e uma segunda com quarenta e oito horas. Todo o conjunto de provas bioquímicas obtidos ao término dos quatro dias de análises foram plotados para uma tabela e a identificação foi baseada na tabela disponibilizada pela empresa fabricante do kit de enterobactérias – *Newprov Produtos para Laboratório Ltda*. Além da confirmação da identificação da bactéria através de bibliografia especializada, assim como o uso da metodologia padronizada de identificação (WINN *et al*. 2012).

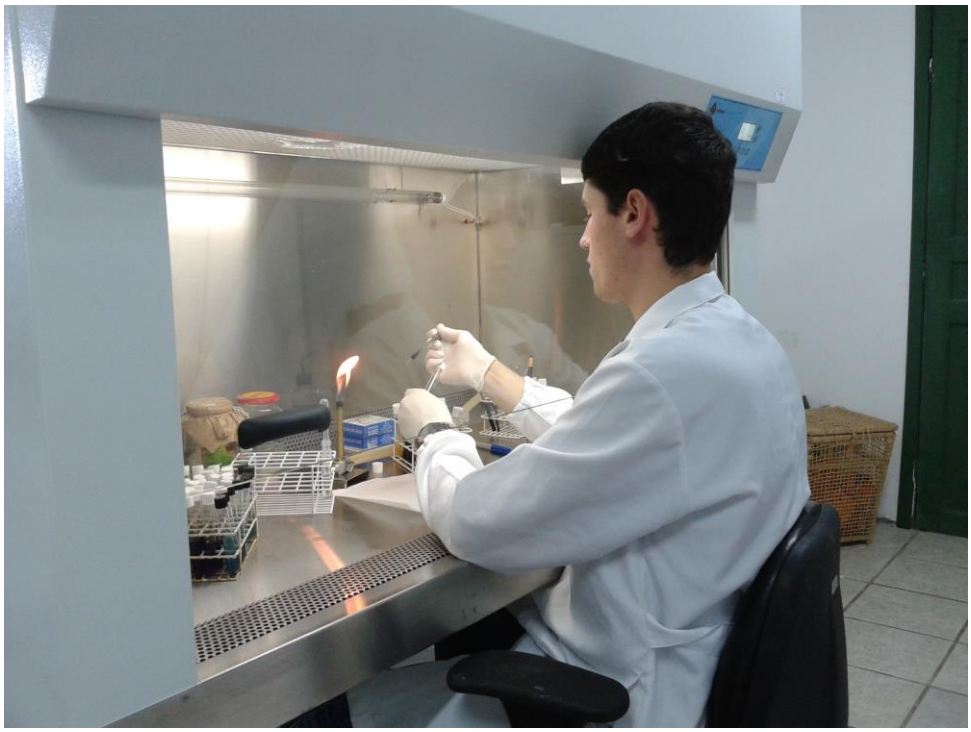

Figura 5: Bolsista PIBIC (Rafael Meurer) inoculando as colônias de bactérias fermentadoras para o kit de enterobactérias dentro da cabine de fluxo unidirecional (MEURER, 2014).

Para os testes estatísticos foi utilizado o software Portal Action que é desenvolvido com base na estatística R e está disponível livremente para download na internet. Objetivo foi saber se existe diferença entre a composição da microbiota dos filhotes em função dos diferentes tipos de ninhos disponíveis para a espécie, para isso foi realizado um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) entre ninhos artificiais de madeira e artificiais de PVC, os ninhos naturais foram descartados devido à obtenção de um n amostral muito baixo ($n = 2$). Ambos os grupos apresentaram distribuição normal para um α de 5%, sendo para os ninhos de madeira $p = 0{,}00000497$ e para os ninhos de PVC $p = 0{,}000000558$.

Em seguida foi realizada uma análise de variância (ANOVA) resultando num valor de $p > 0{,}05$ ($p = 0{,}0518$), mostrando que a microbiota dos filhotes não varia de acordo com o tipo de ninho, porém o valor de p excedeu em apenas uma casa decimal, talvez uma amostragem

de maior número de indivíduos poderia elevar ou diminuir este valor e mostrar uma possível diferença estatística.

6. Resultados

Os conjuntos de dados obtidos ao longo de todas as análises laboratoriais culminaram com o isolamento de cento e vinte e cinco colônias e destas, foram passíveis de identificação vinte espécies, além de duas onde só foi possível se chegar ao nível de gênero. Totalizando doze gêneros de bactérias identificados em 41 filhotes de *Amazona brasiliensis* entre vinte e seis e cinquenta e seis dias de vida. (Tabela 2).

Tabela 2: Prevalência de bactérias isoladas nos três tipos de ninhos amostrados durante o estudo, o ninho natural foi descartado das análises estatísticas devido ao baixo valor amostral (n =2).

Espécie	Prevalência em ninhos de madeira	Prevalência em ninhos de PVC	Prevalência em ninhos naturais
Escherichia coli	21	15	04
Escherichia fergusonii	01	01	-
Klebsiella oxytoca	10	08	01
Klebsiella pneumoniae	07	03	02
Proteus mirabilis	06	02	-
Proteus vulgaris	-	01	-
Citrobacter diversus (koseri)	-	01	-
Citrobacter werkmanii	01	-	-
Citrobacter freundii	-	01	-
Salmonella enteridis (grupo)	03	00	01
Salmonella cholerae-suis	01	01	-
Enterobacter aerogenes	09	03	-
Enterobacter cloacae	01	02	01
Enterobacter gergoviae	01	-	-
Enterobacter sakazakii	02	-	-
Serratia liquefaciens (grupo)	03	02	01
Serratia rubidaea	01	-	-
Morganella morgani	01	01	-
Hafnia alvei	01	01	-
Staphylococcus sp.	02	-	-
Kluyviera sp.	-	01	-
Providencia rittgeri	01	-	-
Total	**72 (n = 24)**	**43 (n = 15)**	**10 (n = 2)**

Entre as espécies bacterianas isoladas podemos destacar quatro espécies: *Escherichia coli* (32%) (Figura 6-A) e *Klebsiella oxytoca* (15,2%) (Figura 6-B), *Klebsiella pneumoniae* (9,6%) e *Enterobacter aerogenes* (9,6%) que juntas compreendem mais de 65% da diversidade bacteriana isolada.

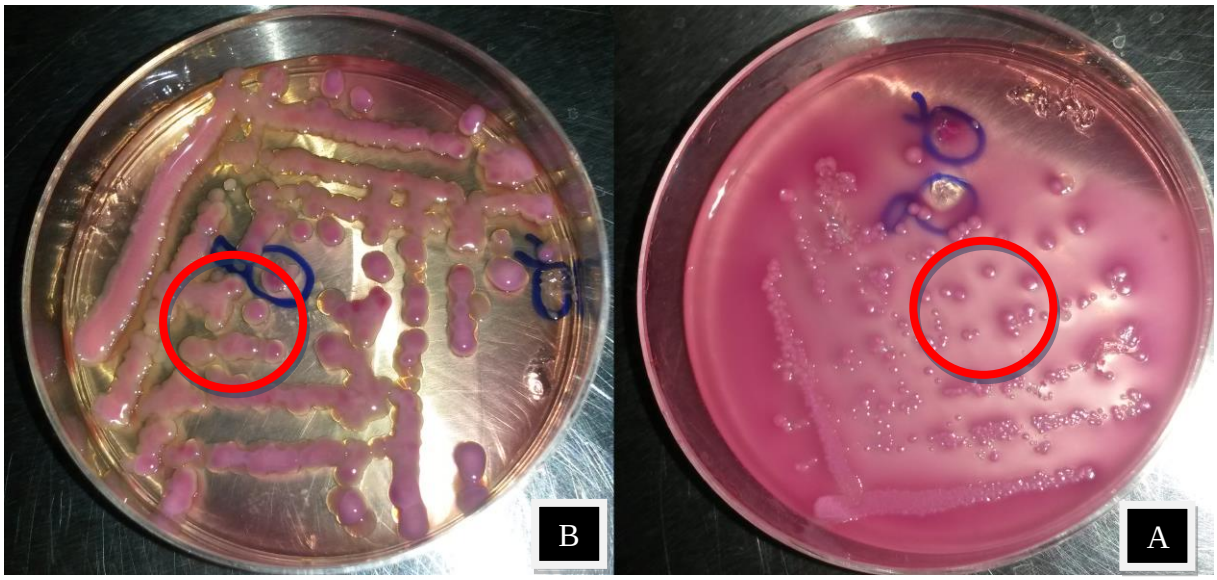

Figura 6: A) Colônias de *Escherichia coli* em ágar MacConckey; B) Colônias de *Klebsiella oxytoca* em ágar Mac Conckey.

7. Discussão

A microbiota intestinal de Psittaciformes é constituída principalmente por bactérias Gram-positivas, podendo aqui destacar os principais gêneros: *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptomyces* spp., *Gaffkya* spp., *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp. não hemolíticos (BANGERT *et al*., 1988; FLAMMER *et al*., 1988). Trabulsi (1996) não considera saudável a presença de bactérias Gram-Negativas em um indivíduo, assim como Hoefer (1997) e Mattes *et al.* (2005) sugerem que *Escherichia coli* não é um componente natural da microbiota entérica de psitacídeos, portanto sua presença estaria associada com a ocorrência de alguma patologia. No trabalho de Saiderberg (2008) ele obteve 40 amostras de filhotes de psitacídeos em vida livre e todas foram positivas para a família Enterobacteriaceae, sendo *Escherichia coli* a espécie mais abundante constando em 62,5% das amostras. Em trabalho similar Bowman & Jacobson (1980) trabalharam com oito espécies de psitacídeos adultos clinicamente saudáveis, relatando uma baixa porcentagem de isolamento de bactérias Gram-negativas, sendo *E. coli* e *Enterobacter* spp. foram isoladas com maior frequência. Bem como, Flammer & Drewes (1988), isolaram em psitacídeos mais de 90% de bactérias Gram-positivas.

A composição da microbiota de filhotes e adultos de psitacídeos em vida livre é diferente devido às condições de higiene dos ninhos, pois ocorre um acúmulo de fezes e matéria orgânica além da possível utilização prévia dos ninhos por outras espécies com a microbiota entérica divergente em relação à de psitacídeos (*e.g.* anatídeos, rapinantes e ranfastídeos) (SAIDERBERG, 2008).

Na temporada reprodutiva de 2013/2014 98,4% das amostras (n = 41 filhotes) foram positivos para a família Enterobacteriaceae. Esta grande prevalência de bactérias Gram-negativas leva a concluir que, em aspectos gerais, os filhotes amostrados apresentam composição da microbiota similar a trabalhos com filhotes de psitacídeos (SAIDERBERG,

2008), considerando as condições de higiene nos ninhos. Assim, obtivemos referências para o conhecimento da microbiota natural, sendo possível fazer seu uso como potencial ferramenta para o monitoramento e conservação. Ainda durante a participação no PIBIC, o bolsista participou da revisão bibliográfica e da redação de um manuscrito envolvendo um estudo preliminar piloto sobre a análise da microbiota de ninhegos de papagaio-de-cara-roxa. A nota foi submetida para a publicação no periódico: Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR.

8. Agradecimentos

Agradeço a Patricia Pereira Serafini, pela oportunidade de trabalho e orientação. Toda a equipe da SPVS também tem o meu agradecimento, pelos momentos incríveis em campo. Queria agradecer também Cristiane K. M. Kolesnikovas, Frederico Fontanelli Vaz e Aurora Vargas Paz pela ajuda dentro do laboratório e com os procedimentos. E meu ultimo agradecimento ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

9. Citações e referências bibliográficas

AGUIRRE, A.; OSTFELD, R.; DASZAK, P. 2012**. New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health**. New York, USA: Oxford University 639 p.

BANGERT, R. L.; *et al*. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 32, n. 1, p. 46-52, 1988.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 3,** de 27 de maio de 2003: Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. <http://www.mp.go.gov.br/nat_sucroalcooleiro/Documentos/legislacao/Geral/fauna/fauna3.pdf> (acessado em 17/07/2014).

BOWMAN, T.A.; JACOBSON, E. R. Cloacal Flora of Clinically Normal Captive Psittacine Birds. ***The Journal of Zoo Animal Medicine***, v.11, n.3, p.81-85, 1980.

CARRILLO, A. *et al*. Conservação do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no Estado do Paraná. Em: M. Galetti e M. A. Pizo (eds). **Ecologia e Conservação de Psitacídeos no Brasil**. Belo Horizonte, MG: Melopsittacus Publicações Científicas, p. 193-213, 2002

COOPER, J. E. Historical survey of disease in birds. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, p. 256-264, 1993.

DIEFENBACH, K. H.; GOLDHAMMER, S. P. Biologie und okologie der rotschwanzamazone *Amazona brasiliensis.* **Trochilus**, v. 7, p. 72-78, 1986.

DITTRICH, J.*et al*. Fontes de variação da morfometria de filhotes do Papagaio -de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*). **XX Congresso Brasileiro de Ornitologia**. 2013 Nov 4-7. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, RS. 2013.

FLAMMER, K.; DREWES, L. A. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds**. Avian Diseases**, v. 32, n. 32, p. 79-83, 1988.

GALETTI, M.; PIZO, M. A. **Ecologia e Conservação de Psitacídeos**. Belo Horizonte, MG: Melopsittacus Publicações Científicas. 2002.

HOEFER, H. L. Diseases of the gastrointestinal tract. *In*: ALTMAN, R **Avian medicine**.B.; CLUBB, S.L.; DORESTEIN, G.M.; QUESENBERY, K. (Eds.). *and surgery*. Philadelphia: Saunders. p. 419-453, 1997.

LAFFERTY, K. D.; GERBER, L. R. Good Medicine for Conservation Biology: the intersection of epidemiology and conservation theory. **Conservation Biology**, v. 16, p. 593-604, 2002.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Eds.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** 1ª Ed., Vol. 2, Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversistas, Brasília, DF, Brasil, 1420p., 2008.

MARTUSCELLI, P. Ecology and conservation of the red tailed Amazon *Amazona brasiliensis* in south-easten Brazil. **Bird Conservation International**. v. 5, p. 225-240, 1995.

MATTES, B. R.**;** *et al*. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.13-16, 2005.

SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas**. São Paulo, 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo.

SCHERER-NETO, P. **Contribuição à biologia do papagaio-de-cara-roxa, *Amazona brasiliensis* (LINNAEUS, 1758) (Psittacidae, aves)**. Curitiba, 1989. 170 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná.

SCHUNCK, F. *et al*. **Plano de Ação para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica**. 1ª ed. Brasília: ICMBio, v. 1, 128 f., 2011.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. São Paulo: Nova Fronteira, 1997.

SIPINSKI, E. A. B**. O papagaio-de-cara-roxa *(Amazona brasiliensis)* na ilha rasa, PR - aspectos ecológicos e reprodutivos e relação com o ambiente**. Curitiba, 2003. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná.

SPVS. **Projeto de Conservação do Papagaio-de-cara-roxa**. 2012. Disponível em <http://www.spvs.org.br/projetos/projeto-de-conservacao-do-papagaio-de-cara-roxa/> (acessado em 18/01/2014).

PORTAL ACTION. **Sobre o Action**. 2014. Disponível em <http://www.portalaction.com.br> (acessado em 01/08/2014).

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Ateneu, p. 386, 1996.

WINN JR, W. et al. **Koneman diagnóstico microbiológico:** texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1565 p. 2012.